

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der
Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie

**Nachweis mesenchymaler Stamm-/Progenitorzellen
im ovinen peripheren Blut und Vergleich mit
mesenchymalen Progenitorzellen aus ovinem
Nabelschnurblut
- eine *in vitro*-Studie -**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinischen Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Olga Grinstein
aus Riga in Lettland

2016

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Jäger
2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. A. Hüttmann

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Februar 2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Knochendefekte – epidemiologischer Hintergrund	5
1.2	Knochendefekt kritischer Größe	6
1.2.1	Definition und Ätiologie	6
1.2.2	Therapie der Wahl	7
1.3	Knochenersatzstoffe	9
1.4	Zellbasierte Therapien von Knochendefekten	12
1.4.1	Stammzeleigenschaften, Mechanismen, Potenzial	12
1.4.2	Klinische Anwendung: Knochenregeneration.....	16
1.4.3	Warum Nabelschnurblut?.....	18
1.4.4	USSC: Kultivierung und Differenzierung	20
1.4.5	Peripheres Blut – eine unterschätzte Quelle?	22
1.5	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Zellkultur.....	24
2.1.1	Probenentnahme und Aufbereitung	24
2.1.2	Zellstimulation	26
2.2	Durchflusszytometrie	28
2.3	Immunzytochemische Färbungen.....	29
2.4	Histologische Färbungen	32
2.4.1	Ölrot O	32
2.4.2	Alizarin rot.....	32
2.4.3	Alkalische Phosphatase.....	32
2.4.4	Alcianblau PAS	33
2.4.5	Safranin O.....	33
2.5	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	34
2.5.1	RNA-Isolation.....	34
2.5.2	PCR-Ansatz	35
2.5.3	Gelelektrophorese.....	37
2.6	Herstellerangaben	38
3	Ergebnisse	41
3.1	Durchflusszytometrische Analyse.....	41

3.1.1	Zusammenfassung Durchflusszytometrie	41
3.2	Mikroskopische Analysen	52
3.3	Immunzytochemische Analysen	54
3.3.1	Peripheres Blut	54
3.3.2	Peripheres versus Nabelschnurblut	61
3.4	Genanalysen	64
3.4.1	Auswertung der RT-PCR	66
4	Diskussion.....	67
4.1	Tiermodell im Tissue Engineering	67
4.1.1	Das Schaf als Tiermodell	71
4.2	Progenitorzellen im peripheren Blut.....	71
4.2.1	Kultivierung und Nachweis	72
4.2.2	Inkubationsbedingungen und Plastizität.....	76
5	Konklusion und Zukunftsausblick	83
6	Zusammenfassung.....	84
7	Literaturverzeichnis	85
8	Anhang.....	96
8.1	Abkürzungen	96
8.2	Abbildungsverzeichnis	99
8.3	Tabellenverzeichnis	103
9	Danksagung.....	104
10	Curriculum Vitae	105

1 Einleitung

In den letzten Jahrzehnten hat die Stammzellforschung immer mehr an klinischer Bedeutung gewonnen. Die Anwendung von Stammzellen bei systemischen Erkrankungen, wie z.B. der AML, diversen soliden Tumoren und Stoffwechseldefekten sowie lokalen Gewebsdefekten, hat Einzug in klinische Prüfungen, aber auch in standardisierte Therapien gefunden.

In der Orthopädie stellen vor allem die Knochen- und Knorpeldefekte aufgrund von Degeneration, Stoffwechselstörungen und Verletzungen wichtige Forschungsbereiche dar.

1.1 Knochendefekte – epidemiologischer Hintergrund

Verschiedene Faktoren machen die Knochendegeneration und chronische Erkrankungen des Stütz- und Bewegungsapparates nicht nur zu einem sozialen, sondern auch einem ökonomischen Problem. Temporäre und dauerhafte Arbeitsunfähigkeit ist Folge steigender Inzidenz von chronischen Wirbelsäulen- und Gelenkerkrankungen sowie Osteoporose. Ursachen sind die steigende Lebenserwartung und nicht zuletzt die steigende Prävalenz an übergewichtigen Menschen. Diese sind nicht nur von kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes mellitus und Neuropathien in erhöhtem Maße betroffen, sondern leiden ebenfalls überdurchschnittlich häufig an Erkrankungen des Stütz- und Bewegungsorgans.

Laut dem kanadischen Endoprothesenregister steigerten sich die Krankenhausaufenthalte aufgrund einer Hüft- oder Knieersatzoperation um 101 % innerhalb von 10 Jahren (Bohm, Dunbar and Bourne, 2010).

Nicht zuletzt können auch immunsuppressive Behandlungen zu Destruktion des Knochens führen. Die Transplantation von Organen oder Knochenmark erfordert z.T. langfristige Behandlungen mit Kortikosteroiden, die das Risiko für avaskuläre Osteonekrosen (u.a. Hüftkopfnekrosen) (Guichelaar et al., 2007) erhöhen.

Anhand dieser Betrachtungen wird deutlich, dass ein dringender Bedarf an innovativen, regenerativen Therapiemöglichkeiten der lokalen Knochen- und Knorpeldefekte besteht.

1.2 Knochendefekt kritischer Größe

1.2.1 Definition und Ätiologie

Ein *Knochendefekt kritischer Größe* (engl. *critical size bone defect* = CSBD) wird definiert als der kleinste orthotope Gewebsdefekt, der keine Spontanheilung zeigt (Spicer et al., 2012). Neben der Defektgröße können auch weitere Faktoren wie Durchblutungsstörungen und Infektionen die Bildung einer Pseudarthrose hervorrufen.

Die Diagnose wird anhand von klinischen Symptomen wie Schmerzempfinden und pathologische Beweglichkeit mit Ausbildung eines Falschgelenkes sowie radiologischen Befunden wie persistierender Frakturspalt, Sklerose der Frakturenenden und/oder hypertrophe oder fehlende Kallusbildung gestellt.

Man unterscheidet hypertrophe und atrophe CSBD: Bei der hypertrophen Variante handelt es sich um einen vitalen Defekt mit ausreichender Blutversorgung, bei dem jedoch eine gestörte Biomechanik (u.a. eine inadäquate Immobilisation) die Regenerationsprozesse stört. Radiologisch ist eine vermehrte Kallusbildung sichtbar. Die atrophe Form ist hingegen durch mangelnde Durchblutung und unzureichende Knochenneubildung gekennzeichnet (Megas and Panagiotis, 2005).

Biologisch führt ein Knochendefekt wie z.B. bei Osteonekrosen, Frakturen oder Osteotomien zunächst zu einer lokalen Entzündungsreaktion bei der u.a. Prostaglandine und andere Zytokine vermehrt synthetisiert und exprimiert werden. Diese stimulieren über verschiedene Signalkaskaden Osteoklasten und Osteoblasten und leiten ein sog. bone remodeling ein. Der Einfluss von transforming growth factor β (TGF β) und bone morphogenetic proteins (BMP) ist in diesem Zusammenhang beschrieben (Dean et al., 2009). Diese physiologischen Reaktionen können jedoch aus unterschiedlichen Ursachen heraus gestört sein. Nicht selten besteht zeitgleich eine Infektion, eine chronische Erkrankung (z.B. Diabetes mellitus, Malignom) oder eine die Regeneration kompromittierende Medikation (z.B. Kortikosteroide, NSAID). Weitere Ursachen für Knochenheilungsstörungen können Rauchen, eine schlechte Blutversorgung des betroffenen Areals und nicht zuletzt ein fortgeschrittenes Alter des Patienten sein. Auch die Größe und Konfiguration des Defekts (z.B. mit/ohne Gelenkbeteiligung), die Stellung der Defektenden zueinander sowie evtl. hinzukommende Weichteilverletzungen und inadäquate Belastung sind

ausschlaggebend für den Erfolg der Regeneration und für die knöcherne Heilung (Megias and Panagiotis, 2005; Horner et al., 2010).

1.2.2 Therapie der Wahl

Um das Risiko einer insuffizienten Knochenheilung zu senken, ist eine optimale Stellung der Defektenden zueinander erforderlich. Diese erreicht man durch interne (z.B. winkelstabile Plattenosteosynthese) oder externe (z.B. Fixateur externe) Osteosynthesevorrichtungen mit oder ohne Knochentransplantate.

Falls es dennoch nicht zu einer suffizienten Knochenheilung kommt, ist der derzeitige Goldstandard zur Förderung der lokalen Knochenformation und des Reparaturprozesses die autologe Knochentransplantation (Khan et al., 2008). Ein häufiger Entnahmeort ist der Beckenkamm. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass Entnahme- und Empfängerort sich in der komplexen Zusammensetzung aus Wachstumsfaktoren, Osteoblasten und -klasten sowie der natürlichen organischen und anorganischen Knochenmatrix als osteogenes Gerüst nicht wesentlich unterscheiden und keine immunologischen Abstoßungsreaktionen bei autologen Transplantaten drohen (Horner et al., 2010; Khan et al., 2008). Limitiert wird diese Methode durch die Größe und Menge des benötigten Transplantats. Zusätzliche chirurgische Eingriffe (im Bereich der Gewebeentnahmestelle) erhöhen zudem die Gefahr von perioperativen Komplikationen (u.a. Verletzung von Leitungsbahnen, persistierende Schmerzen, Infektionen, etc.; s. Abb. 1) und verlängern sowohl die Operationsdauer als auch den Krankenhausaufenthalt. Nicht zu vernachlässigen ist auch das kosmetische Ergebnis einer solchen Gewebeentnahme (Jäger et al., 2005; Pollock et al., 2008). Ältere Patienten profitieren zudem in geringerem Maße von dieser Methode, da sie eine geringere Regenerationspotenz bei erhöhter Entnahmemorbidität zeigen (Jäger et al., 2005).

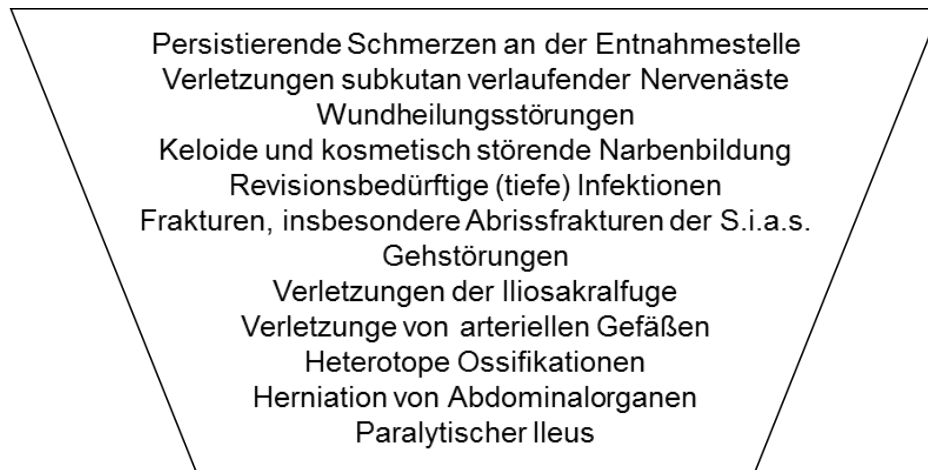


Abb.1 Relative Komplikationshäufigkeit nach Knochenspanentnahme aus dem Beckenkamm unter Berücksichtigung der aktuellen wissenschaftlichen Literatur (mod. n. Jäger et al., 2005)

Um einige dieser Probleme zu umgehen, wurden allogene und xenogene Knochentransplantate getestet. Diese zeigen jedoch eine stärkere Immunogenität als die autologen Transplantate, wodurch das Risiko einer Abstoßung steigt. Zudem weisen sie als avitaler Knochenersatz eine geringere biologische Aktivität (Greenwald et al., 2001) auf. Zu bedenken ist auch das Restrisiko einer Infektionsübertragung vom Spender auf den Empfänger (vgl. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2002). Je nach Literaturangabe liegt die 10-Jahres-Komplikationsrate bei allogenen Transplantaten bei bis zu 60 % und kann schließlich im mechanischen Transplantatversagen enden (Wheeler and Enneking, 2005).

1.3 Knochenersatzstoffe

Als Alternative oder Ergänzung zum autologen/allogenen Transplantat werden Gerüste aus Biomaterialien (Knochenersatzstoffe) eingesetzt, welche die benötigte Menge an autologem Transplantat reduzieren oder dieses gar vollständig ersetzen.

Die am häufigsten verwendeten Stoffgruppen sind Biokeramiken (Hydroxylapatit, β -Tricalciumphosphat u.a.), Polymere (Poly-L-Lactid, Polyglycolid u.a.) und Metalle (poröse Titaniumlägierungen u.a.) (Jäger et al., 2005; Stevens et al., 2008).

Die Anforderungen an diese Werkstoffe sind hoch (Gutowska, Jeong and Jasionowski, 2001; Greenwald et al., 2001; Vermes et al., 2001; Stevens et al., 2008; Dean et al., 2009; Yoshikawa et al., 2009). Idealerweise verfügen sie über die folgenden Eigenschaften:

1. Biokompatibilität: Das in den Körper eingebrachte Material darf weder immunogen noch toxisch oder kanzerogen sein;
2. Osteokonduktion: Einwachsen von Blutgefäßen, welche als Leitschiene für Knochenzellen und den gesamten Knochenformationsprozess dienen. Bildung von Knochengewebe innerhalb einer knöchernen Umgebung;
3. Osteoinduktion: Rekrutierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem umliegenden Gewebe und deren Differenzierung in Osteoblasten. Bildung von Knochengewebe in nicht knöcherner Umgebung. Dieser Vorgang wird durch die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren (z.B. BMP) gefördert;
4. Belastungsstabilität: Das Material soll nach Einbringung zur Stabilisierung des Defekts führen und zeitnahe biomechanische Belastbarkeit ermöglichen;
5. Resorbierbarkeit: Das Material soll resorbierbar sein und über die Zeit durch körpereigenen Knochen ersetzt werden. Dieser Vorgang sollte zeitlich abgestimmt sein, sodass es nicht zum vorzeitigen Implantatversagen und Instabilität kommt. Ist das Material nicht resorbierbar, muss gewährleistet sein, dass es dauerhaft nicht zur Lockerung oder Brüchen des Implantats kommt;
6. Formbarkeit: Das Material soll sich auch komplexeren Defekten geometrisch anpassen und sich gleichmäßig verteilen, ohne dass größere Lücken entstehen. Dies kann v.a. durch injizierbare Werkstoffe realisiert werden.

Nicht zuletzt muss das Material sterilisierbar, möglichst einfach in der Handhabung und Herstellung und kosteneffektiv sein (Greenwald et al., 2001; Stevens et al., 2008).

Bislang wurde kein Ersatzstoff entwickelt, der allen diesen Anforderungen gerecht wird und auch die Kombination verschiedener Materialien (Komposite) hat nicht zu einem idealen Knochenersatzstoff geführt (Stevens et al., 2008). In der Abbildung 2 werden einige Knochenersatzstoffe hinsichtlich Belastungsstabilität und Osteoinduktion miteinander verglichen.

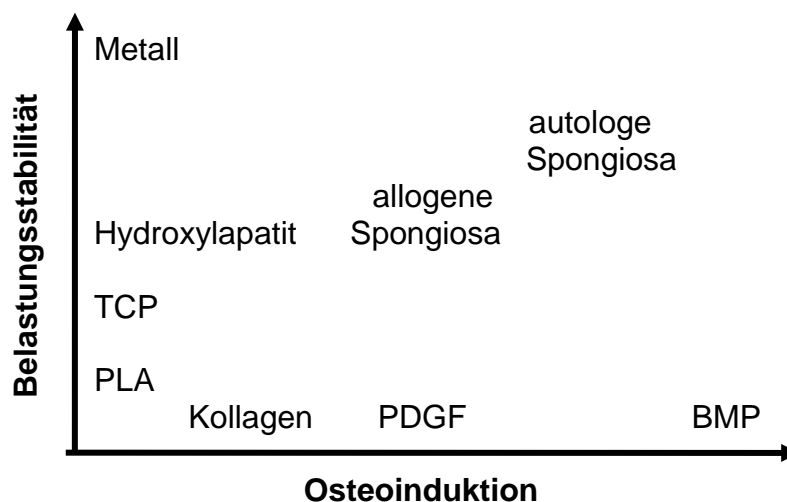


Abb.2 Belastungsstabilität und Osteoinduktion verschiedener Knochenersatzstoffe (PLA:Poly-L-Lactid; TCP:Tricalciumphosphat; PDGF:Platelet-derived Growth Factor; BMP:Bone Monphogenetic Protein); mod. nach C.Niedhart ("Niedhart C, Niethard FU: Klinische Anforderungen an Knochenersatzstoffe. In: Puhl W (Hrsg): Bioceramics in Orthopaedics - New Applications, Ferdinand Enke, Stuttgart, 1998, S. 46-50.")

Diese Abbildung macht deutlich, dass vor allem die Wachstumsfaktoren, im Speziellen die BMP, aber auch PDGF, IGF, FGF und VEGF, eine starke osteogene Potenz aufweisen und deswegen insbesondere im Rahmen klinischer Untersuchungen vielversprechende Kandidaten zur Unterstützung der Knochenformation sind (Vladimirov and Dimitrov, 2004; Devescovi et al., 2008). Sie werden entweder rekombinant hergestellt oder durch Extraktion aus Knochen gewonnen. Dabei wird jedoch, je nach Spenderknochen, ein Gemisch aus verschiedenen Proteinen unterschiedlicher Zusammensetzung und Konzentration gewonnen. Ein Beispiel für ein solches Gemisch ist die demineralisierte Knochenmatrix, wie sie in vielen kommerziell erwerblichen Knochenersatzstoffen vorzufinden ist. Ein zusätzlicher Nachteil ist die Notwendigkeit der Sterilisation, wodurch die Wirksamkeit und die Konzentration der Proteine herabgesetzt wird (Wildemann et al., 2007).

In zahlreichen Tierversuchen und klinischen Studien haben sich insbesondere BMP-2 und -7 aus der TGF- β -Familie als vielversprechende Stimulatoren der

Knochenneubildung bei einem CSBD erwiesen (Wozney and Rosen, 1998; Dean et al., 2009), allerdings sind für die Therapie deutlich höhere Dosen notwendig als im lokalen Knochen vorhanden sind (Wildemann et al., 2007). Weitere entscheidende Faktoren sind die Trägersubstanz und die Anwesenheit von Progenitorzellen, welche mithilfe der Wachstumsfaktoren zu Osteoblasten und –zyten ausdifferenzieren können. Bewährt haben sich v.a. kollagene Trägersysteme in Form eines Kollagen-rhBMP-2-Komposits (Burkus et al., 2004; Windhagen et al., 2004).

Als Ursprungs- und Entnahmeort für mesenchymale Progenitorzellen kann autologes, vakuumaspiriertes Knochenmark aus dem Beckenkamm dienen. Dieses osteogene Material hat bei autologer Applikation den Vorteil einer geringen Immunogenität, ist in der Gewinnung vergleichsweise wenig aufwendig und mit ebenso geringer Spendermorbidity verbunden wie die klassische Knochenspangengewinnung (s. Abb. 1). Autologes Knochenmark bietet jedoch kein osteogenes Gerüst und damit keine zusätzliche Stabilität im Defektbereich. Ist der Knochendefekt auf eine systemische Erkrankung oder Medikation zurückzuführen, kann diese auch die Potenz und Konzentration der Vorläuferzellen im Transplantat negativ beeinflussen (Conboy et al., 2005), so wie es bereits für Faktoren wie weibliches Geschlecht und hohes Alter gezeigt wurde (Muschler et al., 2001).

Es stellt sich die Frage nach der Effizienz von BMP und anderen Wachstumsfaktoren bei der lokalen Knochenregeneration. Neben den relativ hohen Kosten sind auch Nebenwirkungen wie u.a. lokale Entzündungsreaktionen und Osteolysen (Axelrad and Einhorn, 2009) beschrieben. Daher bleibt die evidenzbasierte Anwendung von BMP als Therapieverfahren beschränkt auf atrophe Pseudarthrosen nach offenen traumatischen Tibiafrakturen und Wirbelsäulenfusionen (Garrison et al., 2010), findet jedoch zu etwa 80 % im Rahmen eines off-label use Verwendung. Es wird eine neue Generation von BMP-Therapeutika konzipiert, welche eine bessere Effizienz und eine höhere Sicherheit im klinischen Einsatz aufweisen (Alaoui-Ismaili and Falb, 2009).

1.4 Zellbasierte Therapien von Knochendefekten

1.4.1 Stammzeleigenschaften, Mechanismen, Potenzial

Die Aufgabe der Stammzellen (SC) besteht in lebenslanger Bildung und Rekonstruktion von Geweben bis hin zum kompletten Organismus. Die Voraussetzungen dafür sind die Fähigkeit zur Selbsterneuerung unter Beibehaltung des undifferenzierten Zustandes und die Differenzierbarkeit in zahlreiche Zelllinien.

Die Stammzellen an sich stellen eine heterogene Gruppe dar: Omnipotente SC, die in der Lage sind einen kompletten Organismus zu generieren, finden sich nur im frühen Morula-Stadium. Pluripotente SC sind in der Lage sich in Zellen der drei Keimblätter zu differenzieren. Sie können aber keinen kompletten Organismus mehr generieren. Schließlich die multipotenten SC, die verschiedene Zelllinien ausbilden können (s. Abb. 3). Der zuletzt genannte Typus von SC bleibt auch im erwachsenen Organismus erhalten (adulte SC), z.B. in Form hämatopoetischer und mesenchymaler Stammzellen (MSC) des Knochenmarks. Zuerst beschrieben wurden diese MSC von Friedenstein et al. im Jahr 1966 (Friedenstein, Piatetzky-Shapiro and Petrakova, 1966).

Im Gegensatz zum adulten Organismus ist der Anteil der MSC im fetalen peripheren Blut relativ hoch (Campagnoli et al., 2001).

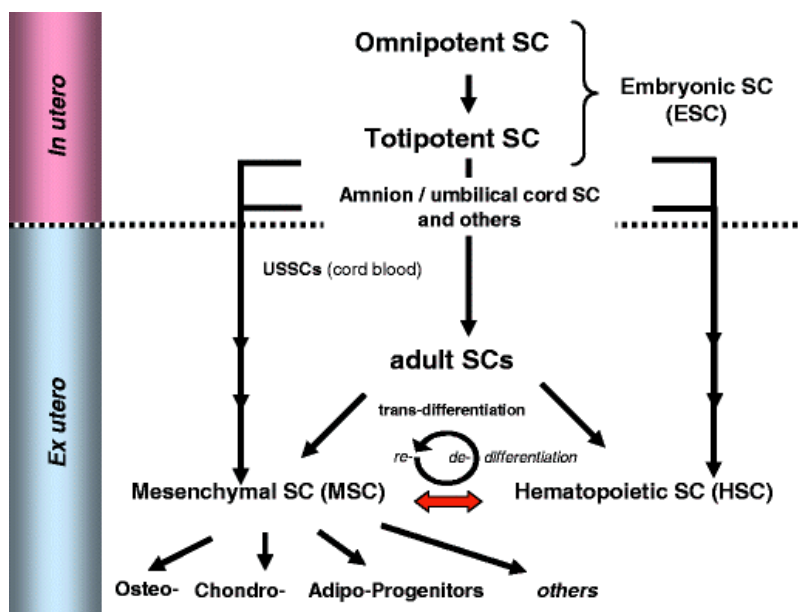


Abb.3 Schema zur Stammzellentwicklung prä- und postnatal (Mod. n. Jäger et al., 2009b)

Während der embryonalen Entwicklung wandern die zirkulierenden SC aus dem peripheren Blut in sog. *Nischen* ab. Dieser Begriff wurde 1978 von *Schofield* geprägt und impliziert die Bedeutung des Mikromilieus (direkte Zellkontakte, extrazelluläre Matrix, Sauerstoffkonzentration etc.) für die Differenzierung, Proliferation und das sog. '*Homing*' der SC. Die erstbeschriebene *Nische* war das Knochenmark, wo die MSC als weitere Zelllinie neben der hämatopoetischen Stammzelllinie entdeckt wurden und deren gegenseitige Beeinflussung bis hin zur Transdifferenzierung untersucht wurde (Bianco, Robey and Simmons, 2008; Jäger et al., 2009b).

Im Laufe der vergangenen Jahrzehnte wurden MSC auch aus zahlreichen anderen Geweben isoliert, u.a. aus Periost, Synovialmembran und -flüssigkeit, Fettgewebe, Dermis, Skelettmuskel, Plazenta, peripherem Blut und Nabelschnurblut (Bianco et al., 2008; Fan et al., 2009b; Huang, Gronthos and Shi, 2009; Jäger et al., 2009b). Man vermutet sogar, dass in nahezu allen Organen und Geweben adulte Progenitorzellen existieren. Es wird allerdings immer noch kontrovers diskutiert, ob es sich dabei um zirkulierende Zellen mit gemeinsamem Ursprung im Knochenmark handelt oder ob es eher organspezifische Subgruppen innerhalb der MSC-Familie sind. Durch den Mangel an spezifischen *in vivo*-Markern und in Anbetracht der Möglichkeit, dass sich die Zellen unter Kulturbedingungen sowohl phänotypisch als auch in ihrer Oberflächenmarkerexpression verändern (Jones et al., 2002), lässt sich die Frage nach dem Ursprungsgewebe zur Zeit noch nicht abschließend beantworten.

Die Nomenklatur dieser Zellpopulation bleibt daher bis heute uneinheitlich. Die *International Society for Cellular Therapy* hat im Jahr 2005 die biologisch korrektere Bezeichnung „multipotente mesenchymale Stromazellen“ vorgeschlagen, bei der das in der Literatur etablierte Akronym „MSC“ beibehalten wird (Horwitz et al., 2005). Eine weitere, häufig verwendete Bezeichnung ist „mesenchymale Progenitorzellen“ (Fischer, 2008).

Der Nachweis der MSC erfolgt meist retrospektiv über die von der *International Society for Cellular Therapy* im Jahr 2006 formulierten Minimalanforderungen an humane multipotente mesenchymale Stromazellen: Plastikadhärenz unter Zellkulturbedingungen, eine fibroblastoide Morphologie und das *in vitro* Differenzierungspotenzial zu Adipozyten, Osteoblasten und Chondroblasten. Hinzu kommen die Expression der Oberflächenmarker CD105,

CD73, CD90, CD29, CD13, CD44 und STRO-1 und das Fehlen von hämatopoetischen Markern wie CD14, CD45 und CD34 (Bobis, Jarocha and Majka, 2006; Dominici et al., 2006; Fischer, 2008). Einige wenige prospektive *in vivo* Marker wurden in aktuellen Studien beschrieben, darunter CD271 (LNGFR) und CD49a in Kombination mit fehlender bzw. geringfügiger CD45-Expression (Jones et al., 2006). Bei der Isolation aus der Plazenta wurde SSEA-4 als embryonaler Stammzellmarker verwendet (Battula et al., 2007).

Bei der Erforschung der Frage nach dem Ursprungsgewebe der MSC ergaben sich jüngst Hinweise darauf, dass der perivaskuläre Raum eine bedeutende Rolle in der *Nischen*-Hypothese haben könnte: Ein gewisser Anteil der isolierten MSC weist die Oberflächenmarker CD146 und STRO-1 (stromal precursor antigen-1) sowie das α -Aktin und 3G5-Antigen auf, die ebenfalls auf Perizyten nachweisbar sind (Zannettino et al., 2008). Diese Erkenntnis lässt vermuten, dass auch Perizyten eine Quelle für MSC darstellen könnten, was in Anbetracht der Nähe zum Gefäßsystem und somit einer raschen Rekrutierung der MSC durchaus plausibel erscheint. Dagegen spräche jedoch die Tatsache, dass MSC auch aus gefäßarmem Gewebe wie Gelenkknorpel isoliert wurden (Dowthwaite et al., 2004).

Intravenös applizierte MSC lassen sich in akut verletztem Gewebe *in vivo* nachweisen. Die Eigenschaft der Zellen zu ihrem Ursprungsort zu migrieren bezeichnet man als '*Homing*', welches eine wichtige Voraussetzung für eine zellbasierte Therapie darstellt. Die *Homing*-Mechanismen sind komplex und nicht bis in das letzte Detail bekannt. Sie werden über das jeweilige Mikromilieu und v.a. über Chemokine und Zytokine reguliert. Eine wichtige Rolle scheint dabei die SDF-1 α /CXCR4-Achse zu spielen: Eine Überexpression von CXCR4 wurde im infarzierten Myokard nachgewiesen und führte zur Gewebsregeneration über Angiogenese u.a.. Die Unterbrechung der Achse über neutralisierende Antikörper führt wiederum zur partiellen Blockade des *Homings* (Walter et al., 2005).

Insgesamt beinhaltet das *Homing* eine Kette von Ereignissen, angefangen bei der Mobilisation, über das Rollen entlang des Endothels und die Adhäsion, bis hin zur Extravasation und Migration ins Zielgewebe. Alle diese Vorgänge sind aus der Molekularbiologie von Leukozyten bekannt. Für MSC lassen sich einige der Moleküle nachweisen, die bei Immunzellen für diese Vorgänge verantwortlich sind, darunter das P-Selektin (Rollen), zahlreiche VCAM- und ICAM-Moleküle sowie Endoglin/CD105 und das *very late antigen 4* (VLA-4) (Adhäsion), welches auf einem

beträchtlichen Anteil humaner MSC nachgewiesen wurde (Liu, Zhuge and Velazquez, 2009). Über gezielt veränderte Glykosylierung von CD44 konnte ein präzises *Targeting* von humanen MSC in den Knochen erreicht werden (Sackstein et al., 2008). Am Zielort angekommen proliferieren die Zellen und durchlaufen eine spezifische Differenzierung. Für den Nachweis von Progenitorzellen muss osteo-, chondro- und adipogenes Differenzierungspotenzial gezeigt werden. Darüber hinaus wurde die Differenzierungsfähigkeit in Kardio-/Myozyten (Wakitani, Saito and Caplan, 1995) und sogar in nicht mesenchymale Zelllinien wie z.B. Neurone gezeigt, wobei diese kontrovers diskutiert wird (Hofstetter et al., 2002). Eine gezielte Differenzierung *in vitro* setzt definierte Inkubationsbedingungen voraus, wobei jede Zelllinie ihre ganz eigene Kombination aus Wachstumsfaktoren benötigt. Es werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, welche ihrerseits die Produktion von zellspezifischen Proteinen induzieren. So sind für die Chondrogenese einige Vertreter der TGF- β -Familie und BMP verantwortlich (Barry et al., 2001), für die Adipogenese werden Dexamethason, Insulin, Isobutyl-methyl-Xanthin und Indomethacin eingesetzt, Osteogenese wird durch Ascorbinsäure, Dexamethason und β -Glycerophosphat induziert (Pittenger et al., 1999b). Dies gilt allerdings nur für die Zellkulturbedingungen, die *in vivo*-Mechanismen sind bislang nur partiell verstanden (s. Abb. 4).

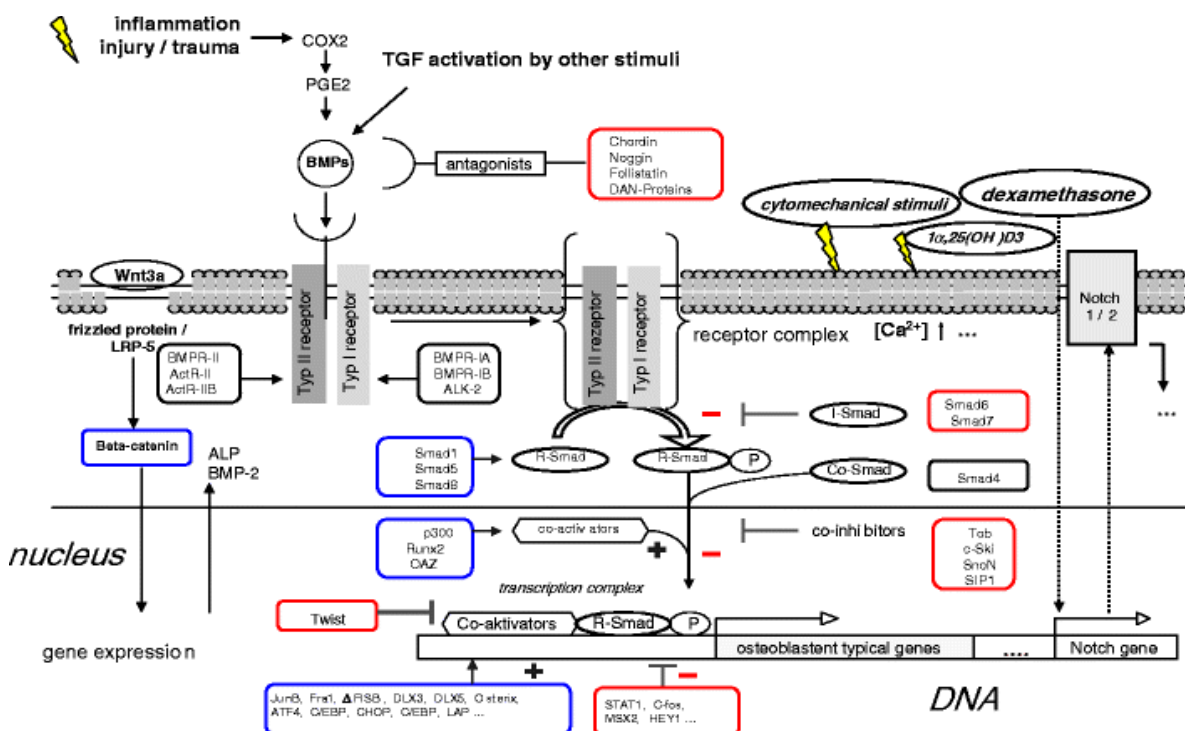


Abb.4 Molekulare Mechanismen der Induktion osteogener Differenzierung von humanen MSC nach Inflammation/Verletzung/Trauma (Jäger et al., 2009b).

Zudem hat sich gezeigt, dass es Subgruppen innerhalb der MSC gibt, welche unterschiedliche Differenzierungsprofile zeigen: Die klonalen Populationen sind alle zu einer osteogenen Differenzierung in der Lage, die meisten besitzen zudem chondrogenes Potenzial, aber nur einige besitzen die Fähigkeit zur adipogenen Differenzierung (Karystinou et al., 2009). In diesem Zusammenhang spricht man von einem „hierarchischen Differenzierungsmodell“ (Muraglia, Cancedda and Quarto, 2000) mit dominierender osteogener Achse. Inwiefern sich diese Ergebnisse auf MSC verschiedenen Ursprungs übertragen lassen ist ungeklärt. Es ist möglich, dass die einzelnen Subgruppen eine Gewebsspezifität und damit unterschiedliches Potenzial aufweisen, wie dies von Gronthos bereits für MSC aus der Pulpa gezeigt wurde (Gronthos et al., 2002). Hinzu kommt die nicht zu vernachlässigende interindividuelle Variabilität.

1.4.2 Klinische Anwendung: Knochenregeneration

Nachdem die hämatopoetischen Stammzellen bereits seit vielen Jahrzehnten in der Therapie von systemischen Erkrankungen, wie u.a. Leukämien, Verwendung finden, zieht der Einsatz mesenchymaler Stammzellen aufgrund der hohen osteogenen und chondrogenen Potenz nun auch die zunehmende Aufmerksamkeit orthopädisch-chirurgischer Fächer auf sich. Hinzu kommt das geringe immunogene Potenzial der Zelltransplantate bei autologer Applikation, bis hin zu immunsuppressiven Eigenschaft (Kode et al., 2009).

Die ersten Versuche zum sog. *Tissue Engineering*, im Speziellen der Knochenregeneration unter Einsatz von Stammzellen, wurden bereits Ende der 1960er Jahre von Friedenstein mit Progenitorzellen aus dem Knochenmark durchgeführt (Friedenstein et al., 1966). Seitdem man in der Lage ist Wachstumsfaktoren industriell herzustellen, werden u.a. auch BMP-beschichtete Trägersubstanzen untersucht, um zusätzlich lokale MSC zu aktivieren und eine osteogene Differenzierung zu fördern (Lane et al., 1999). Auch mit MSC beschichtete Trägersysteme zeigen vielversprechende Ergebnisse im CSBD-Tiermodell (Petite et al., 2000). Der Einsatz von Trägerwerkstoffen bietet sich bei der *per definitionem* guten Oberflächenadhärenz der MSC geradezu an und so zeigen einige Ansätze mit 3D-Modellen wie z.B. Hydroxylapatit-Partikeln oder Kollagenschwämmen eine Verstärkung der osteogenen Potenz (Fischer et al., 2003).

Insgesamt ergeben sich zwei Anwendungsmöglichkeiten für Zelltherapeutika (Jäger et al., 2010):

1. Applikation ohne kulturelle Vermehrung, wie sie bei der Knochenmarkaspiration mit oder ohne anschließende Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation mononukleärer Zellen erfolgt. Dabei kommen sowohl MSC als auch hämatopoetische Progenitorzellen zum Einsatz. Die Vorteile bestehen im simultanen Vorgehen und der Reduktion der körpereigenen Knochenentnahme bei Kombination mit einem Biomaterial (Jäger et al., 2009a), wodurch das Komplikationsrisiko verringert wird. Nachteilig ist die Variationsbreite der Zellausbeute (Hernigou et al., 2005) bei variierender Aspirationstechnik und der interindividuell unterschiedlichen Transplantatqualität (s. S. 8).
2. Applikation nach *ex vivo*-Kultivierung, die mit osteogener Stimulation kombiniert werden kann. Diese ermöglicht zum einen die Erzeugung einer adäquaten Menge an MSC, um auch größere Defekte versorgen zu können, zum anderen wird durch die Vordifferenzierung der Zellen die Osteogenese vorangetrieben (Morishita et al., 2006). Problematisch sind die nicht kalkulierbaren Vorgänge bei Überführung der Zellen in Kulturbedingungen (Jäger et al., 2003). Hinzu kommt die Problematik der Zellalterung und möglichen Genomveränderungen (Dahl et al., 2008), die noch weitestgehend unerforscht sind. Auf diesem Gebiet gibt es Ansätze mit cDNA-Transfer von humaner Telomerase-reverser-Transkriptase, welche die Telomere rekonstruieren soll (Nakahara et al., 2009). Akay hat zudem gezeigt, dass undifferenzierte MSC im Gegensatz zu chondrogen „vordifferenzierten“ Zellen ein Tumorwachstum fördern (Akay et al., 2010).

Lokale Knochendefekte wurden bereits erfolgreich mittels Zelltherapie behandelt. Zamzam zeigte, dass über 80% der Patienten mit solitären Knochenzysten geheilt werden können, eine komplette Rückbildung erfolgte in über einem Drittel der Fälle (Zamzam et al., 2009). Hernigou zeigte eine Korrelation zwischen mineralisiertem Kallusvolumen und der applizierten Progenitorzellzahl bei Tibiapseudarthrosen: Über 1.500 Zellen/cm³ waren für eine Ausheilung notwendig (Hernigou et al., 2005). Weitere Erfolge werden in der Therapie von Osteonekrosen mit lokaler Stammzellinjektion nach einer *Core decompression* verzeichnet (Jones et al., 2008; Calori et al., 2014). Dabei profitieren v.a. Patienten im Stadium I-II nach ARCO-Klassifikation (Hernigou et al., 2009). Der Einsatz von MSC-βTCP-

Kompositen im Spätstadium von steroidassoziierten Femurkopfnekrosen (ARCO III-IV) zeigte wiederum unzureichende Ergebnisse (Kawate et al., 2006).

Eine weitere Anwendung des *Tissue Engineering* ist die Behandlung von Knorpeldefekten: Im Tierexperiment wurden perichondrale MSC nach cDNA-Transfer von BMP-2 und IGF-1 in ein defektes Kniegelenk eingebracht und führten dort zur Produktion von Kollagen II-haltiger Matrix (Gelse et al., 2003).

Systemische Anwendung findet die Stammzelltherapie v.a. in Studien zu der Osteogenesis imperfecta (OI) (Bobis et al., 2006). Die erste allogene Transplantation von KM-MSC bei Kindern mit OI wurde 1999 von Horwitz durchgeführt und zeigte eine Zunahme der mineralisierten Knochenmatrix und der Wachstumsrate sowie eine Abnahme der Frakturanzahl (Horwitz et al., 1999). Drei Jahre später gelangen Horwitz noch bessere Ergebnisse unter zusätzlichem Einsatz von *ex vivo* kultivierten allogenen MSC: Im sechsmonatigen Beobachtungszeitraum wurden Wachstumsraten von 60-94%, verglichen mit der gesunden Normalpopulation, erreicht, bei zuvor gemessenem Mittelwert von 20% (Horwitz et al., 2002). Allerdings zeigte sich, bis auf einen Fall, keine Zunahme der Mineralisierung im Gegensatz zur KMT-Kohorte (Horwitz et al., 1999). Das im Kulturmedium enthaltene fetale Kälberserum (FBS) wurde zuvor wärmebehandelt und zeigte nur bei einem der sechs behandelten Kinder erhöhte Antikörper-Titer (Horwitz et al., 2002).

Es ist noch nicht endgültig geklärt, welche Anwendungsgebiete für die Stammzelltherapie in Frage kommen oder gar einen Benefit im Vergleich zu anderen Therapieformen bringen. Eine weitere Frage stellt sich bezüglich der Quelle für die applizierten MSC. In den meisten klinischen Studien werden Knochenmark-MSC verwendet, was allerdings die bereits oben angesprochene Problematik der Variabilität und der recht invasiven Methode der Zellgewinnung (Punktion n. *Jamshidi*) birgt. Es bleibt zu untersuchen, ob nicht auch MSC aus anderen Geweben gefahrloser gewonnen werden können und dabei eine vergleichbare osteogene Potenz bieten.

1.4.3 Warum Nabelschnurblut?

Der klinische Einsatz von Stammzellen aus dem Nabelschnurblut (CB) hatte seine Geburtsstunde 1988 als Gluckman die erste Transplantation bei Patienten mit *Fanconi*-Anämie durchführten (Gluckman et al., 1990). Seitdem hat sich der Einsatz

hämatopoetischer Vorläuferzellen aus dem Nabelschnurblut in der Hämatonkologie, v.a. im pädiatrischen Bereich, etabliert.

Ein wichtiger Aspekt ist die geringere Immunogenität im Vergleich zu Knochenmark-SC, was in Untersuchungen sowohl mit HLA-identischen als auch mit nicht-identischen Transplantaten gezeigt werden konnte (Wagner et al., 1996; Majhail et al., 2008). Es sind sogar immunsuppressive Eigenschaften für CB-SC beschrieben, die über eine verminderte Proliferation von T-Lymphozyten eine Immunantwort (*Graft-versus-host-disease*) reduzieren können (Tisato et al., 2007; Gonzalo-Daganzo et al., 2009; Kode et al., 2009). Typischerweise exprimieren CB-SC nur wenig MHC I und sind negativ für MHC II, allerdings hat man nach wiederholter Injektion des Transplantats und Injektionen in entzündetes oder zuvor mit IFN γ vorbehandeltes Gewebe eine vermehrte Expression von MHC II festgestellt (Cho et al., 2008). Weitere Untersuchungen bestätigten den Einfluss von lokalen Zytokinen wie IL-2, -3, -6, G-CSF und Erythropoetin auf das Verhalten von CB-SC, bis hin zur Ausbildung zytotoxischer Eigenschaften gegen maligne Zellen (Urashima et al., 1995; Germenis and Karanikas, 2010).

Nicht zu vernachlässigen ist die bereits angesprochene Problematik der Zellalterung. Sobald die Zellen aus ihrer natürlichen *Nische* isoliert werden, beginnen die Prozesse der Telomerverkürzung und Apoptose, was in Anbetracht der geringen Ausbeute an Progenitorzellen den klinischen Einsatz noch weiter erschwert (Jäger et al., 2009b). Die Auswirkungen des Gentransfers bzw. der Genaktivierung auf diesem Gebiet sind noch weitestgehend unerforscht und lassen eine Tumorförderung nicht ausschließen (Hilton et al., 2008; Nakahara et al., 2009).

Im Fall der CB-MSC, deren Subgruppe als *Unrestricted Somatic Stem Cells* (USSC) bezeichnet wird, sinkt die initiale Verdopplungszeit (ca. 39 Stunden) mit steigender Passagezahl geringfügig. Die Zellen behalten ihre Proliferationskapazität und Plastizität bis zur 23. Passage bei (Degistirici, Jäger and Knipper, 2008). Im Vergleich zu KM-MSC und Progenitorzellen aus Fettgewebe zeigten die USSC die längste Kultivierungsperiode und die höchste Teilungsrate (Kern et al., 2006; Zhang et al., 2011). Dies ist mit den Ergebnissen von Chen zu vereinbaren, die eine hohe Telomeraseaktivität in proliferierenden mononukleären Zellen aus dem Nabelschnurblut zeigen (Chen et al., 2007).

Aber nicht nur die notwendige *in vitro*-Expansion wirkt sich auf die Zellalterung aus, sondern auch das Spenderalter. Es wurde gezeigt, dass sowohl die Proliferation

als auch die osteoblastäre Differenzierungskapazität der humanen KM-MSK mit dem Alter des Spenders abnehmen und der Anteil apoptotischer Zellen zunimmt. Es gibt Hinweise darauf, dass die altersabhängige Hochregulation der p53-, p21- und BAX-Gene eine Rolle dabei spielt (Zhou et al., 2008). Hinzu kommt der ohnehin schon geringe Anteil an MSC im Knochenmark (0,001-0,01 %) (Pittenger et al., 1999b). Im Gegensatz dazu steuern die USSC möglicherweise sogar Zellalterungsprozessen entgegen, so wie es am Beispiel von Hippocampus-Neuronen gezeigt werden konnte (Chen et al., 2010).

Sowohl durch die aktuelle Rechtslage zur embryonalen Stammzellforschung in Deutschland als auch durch ethische Aspekte sind die Ansprüche an die Gestaltung der Stammzellforschung sehr hoch. In Anbetracht dessen bietet der Einsatz von USSC eine sinnvolle Alternative, die ohne einen invasiven Eingriff und unter Umgehung einer möglichen Spendermorbidity auskommt.

Weitere Vorteile gegenüber adulten Progenitor-/Stammzellen ist die geringe Rate an viraler Kontamination (Behzad-Behbahani et al., 2005) sowie die einfache Gewinnung und Handhabung mit der Möglichkeit zur Kryokonservierung.

Bis heute wurden nur ca. 20.000 CB-SC-Transplantationen durchgeführt, in den meisten Fällen zur Restitution des hämatopoetischen Systems (Forraz and McGuckin, 2011). Dabei stellt das neonatale Gewebe wie Nabelschnur und Plazenta mit über 100 Mio. Geburten pro Jahr weltweit die größte und genetisch variabelste Quelle für Progenitor- und Stammzellen dar (Forraz and McGuckin, 2011). Seine Möglichkeiten sind keinesfalls durch den Einsatz in der Hämatookologie ausgeschöpft.

1.4.4 USSC: Kultivierung und Differenzierung

Bis vor einiger Zeit war der Einsatz von CB-Zellen auf den hämatologischen Erkrankungskreis beschränkt (Newcomb et al., 2007). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass neben den hämatopoetischen Progenitorzellen weitere Zelltypen im Nabelschnurblut vorliegen, welche unter bestimmten Stimuli in mesenchymale Zelllinien, u.a. Osteoblasten, Chondroblasten und Adipoblasten, differenzieren können (Jäger et al., 2004; Kögler, Sensken and Wernet, 2006; Degistirici et al., 2008), wodurch sie für das Gebiet des *Tissue Engineering* interessant werden.

Die Empfehlungen für optimalen Inkubationsbedingungen für die osteogene Differenzierung von USSC sind nicht einheitlich, allerdings scheint Dexamethason/Ascorbinsäure/ β -Glycerophosphat (DAG) hierbei die effektivste Agenskombination zu sein (Jäger et al., 2003; Degistirici et al., 2008). Es wurde sogar eine spontane osteogene Differenzierung in unstimulierten Kulturen beobachtet, sodass unter bestimmten Umständen eine Präkonditionierung bei lokaler Anwendung entfallen könnte (Rosset and Coipeau, 2007; Degistirici et al., 2008). Für die Kultivierung der Zellen wird FBS mit einem Anteil von über 10 % eingesetzt, wobei die darin enthaltenen Faktoren und ihr Einfluss auf die Zellen noch nicht bekannt sind (Degistirici et al., 2008).

Während der osteoblastären Differenzierung verändert sich das ursprüngliche Zytokinmuster der MSC: Zuerst steigt die Sekretion von IL-6, -8, -9, -10, -12, FGF, GM-CSF, *Inducible Protein* (IP)-10, MIP-1 β , TNF α , MCP-1 und VEGF. Mit zunehmender Differenzierung nimmt der Anteil an IL-6, MCP-1 und MIP-1 β stark ab (Flynn, Barry and O'Brien, 2007; Jäger et al., 2009b). Diese Marker besitzen nicht nur immunmodulatorische Aufgaben, sondern aktivieren auch die Osteoklastenfunktion und treiben damit die Knochenresorption voran, sodass der Konzentrationsabfall von entscheidender Bedeutung für die Osteogenese ist (Udagawa et al., 1995; Jäger et al., 2009b). Im Gegensatz dazu steigt die Konzentration von IL-10, IL-12, FGF und VEGF, wobei die Rolle des VEGF als früher Wachstumsfaktor bei der Osteogenese bereits von Huang beschrieben wurde (Huang et al., 2007).

Zudem wurde gezeigt, dass es zwischen den mesenchymalen und hämatopoetischen Progenitorzellen über Zellkommunikation und Wachstumsfaktoren zur gegenseitigen Beeinflussung im Sinne einer gesteigerten Expansion und Differenzierung bis hin zur Transdifferenzierung kommen kann (Park et al., 2009; Wang et al., 2011). Das untermauert nicht nur die Bedeutung der *Nische* für die Plastizität der Zellen, sondern eröffnet zudem einen klinisch relevanten Aspekt der Zellkultivierung, -stimulation und -transplantation.

Die Zellkomponenten des Nabelschnurblutes sind heterogen. Lu hat gezeigt, dass MSC eine Subgruppe innerhalb der CD34(-)-Fraktion sind (Lu et al., 2010). Darin sind wiederum zwei Populationen zu unterscheiden: Die spindelförmige CD90 positive Population und die flach geformte CD90 negative Population, wobei die

zweitgenannte eine geringere adipogene Tendenz aufweist (Chang et al., 2006). Eine exakte Zuordnung der einzelnen Subgruppen ist bislang nicht erfolgt.

Eines der Probleme, die das Nabelschnurblut als MSC-Quelle mit sich bringt, ist die relativ niedrige Ausbeute und der insgesamt geringe Anteil an MSC im Vergleich zum Knochenmark und Fettgewebe, allerdings wird dieses Problem durch die enorme Proliferationskapazität der USSC relativiert (Yang et al., 2004; Kern et al., 2006; Kögler et al., 2006).

Dieses Beispiel sollte dazu ermutigen weitere Quellen zu untersuchen, die bislang als wenig ergiebig galten, wie z.B. das periphere Blut.

1.4.5 Peripheres Blut – eine unterschätzte Quelle?

Das Konzept der Stammzellmobilisation und Ausschüttung ins periphere Blut über Wachstumsfaktoren (z.B. G-CSF) ist seit langem etabliert und klinisch hoch relevant im Rahmen der autologen SC-Transplantation und -Spende. Inzwischen wurde eine vermehrte Zirkulation von SC auch unter pathologischen Bedingungen festgestellt, u.a. nach Myokardinfarkt, bei Verbrennungsoptern, bei rheumatoiden Arthritiden und Atemwegserkrankungen (Augello, Kurth and De Bari, 2010).

Die Existenz von mesenchymalen Stammzellen im normalen peripheren Blut (PB) bleibt bis heute umstritten. Der Nachweis von MSC über die gleichen Parameter, wie sie beim Knochenmark angewandt werden, gelingt nicht immer. Jones und McGonagle sowie Wexler konnten keine CFU-F in den PB-Proben nachweisen (Wexler et al., 2003; Jones and McGonagle, 2008). Andere Arbeitsgruppen haben wiederum zeigen können, dass PB-MSc ähnliche Charakteristika wie die BM-MSc haben, sowohl was ihre Oberflächenmarker als auch ihre Differenzierungsfähigkeit betrifft (Chong et al., 2011).

Die zellulären Bestandteile des Blutes sind rote und weiße Blutkörperchen sowie Thrombozyten. Über eine Dichtegradientenzentrifugation nach *Ficoll* lassen sich die einzelnen Komponenten in Schichten aufspalten. Aus der heterogenen Schicht der mononukleären Zellen (zu 95 % Lymphozyten) lassen sich zwei Zellpopulationen isolieren: adhärenente, fibroblastoide Zellen und Zellen in Suspension mit einem rundlichen Kern. Molekulare und immunzytochemische Analysen haben gezeigt, dass es sich bei der erstgenannten Population um MSC handelt und bei der zweitgenannten um hämatopoetische Stammzellen, welche in Osteoblasten

(mesenchymale Zelllinie) bzw. Osteoklasten (hämatopoetische Zelllinie) ausdifferenzieren können (Yazid et al., 2011). Durch Kultivierung über mehrere Passagen lässt sich der Anteil an MSC steigern und die Zahl der hämatopoetischen SC senken, was zu einer vergleichbaren Menge an MSC führt wie sie im KM-Konzentrat vorzufinden ist (Pittenger et al., 1999a; Tondreau et al., 2005). Durch eine Vorselektion, z.B. über CD133 als Marker für frühe Blutvorläuferzellen, lässt die MSC-Ausbeute möglicherweise noch weiter steigern. Dieser Marker kennzeichnet eine primitivere Zellfraktion als das CD34. Sie enthält sowohl hämatopoetische als auch mesenchymale Vorläufer (Tondreau et al., 2005).

In Anbetracht der vielversprechenden Ergebnisse sollte das periphere Blut als leicht zugängliche Quelle von Stammzellen tiefergehend untersucht werden.

1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Knochen- und Knorpeldegeneration bedarf als relevantes gesundheitspolitisches Problem innovativer regenerativer Therapiemöglichkeiten. Eine wichtige Rolle dabei nimmt inzwischen die Erforschung sog. mesenchymaler Progenitorzellen ein.

In dieser Arbeit soll an dem Tiermodell Schaf die Anwesenheit der Progenitorzellen im normalen, nicht medikamentös oder krankheitsbedingt veränderten, peripheren Blut untersucht werden. Zudem sollen ihre Eigenschaften als multipotente Progenitoren getestet und mit den MSC aus ovinem Nabelschnurblut verglichen werden.

2 Material und Methoden

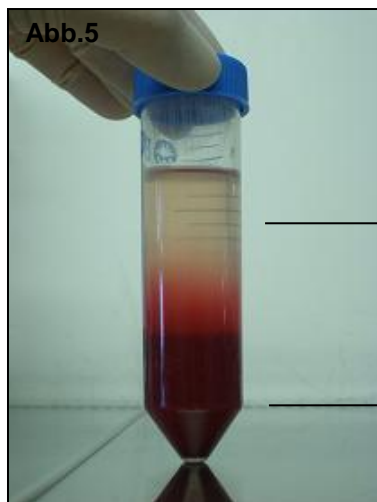
2.1 Zellkultur

2.1.1 Probenentnahme und Aufbereitung

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um Zellen aus dem Vollblut, das im Rahmen des Schlachtvorganges aus der Karotisarterie von sechs Lämmern entnommen wurde. Die Lämmer waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme ca. vier Monate alt und gehörten der Rasse Texel-Milchschaaf-Kreuzung an.

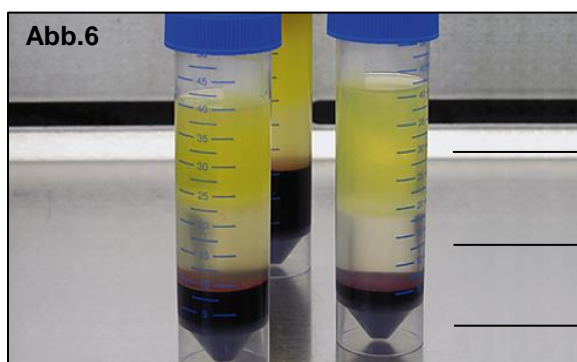
Die Proben des Nabelschnurblutes wurden im Anschluss an zwei *Sectiones caesareae* aus jeweils einer Nabelschnurvene mithilfe von sterilen Kanülen in Spritzen mit vorgelegter Heparin-Lösung entnommen und unterliefen der gleichen Verarbeitung wie das periphere Blut (s. unten).

Das Blut wurde in sterile 100 ml Urinbecher aufgenommen. Dieser enthielt eine 1 %ige Heparin-natrium-Lösung (5000 i.E, *Ratiopharm Art.Nr. X68743.03*) und wurde mit 90 ml Blut aufgefüllt. Die Isolation der MSC erfolgte über eine Dichtegradientenzentrifugation nach *Ficoll*. Die 90 ml Blut-Antikoagulanzen-Suspension wurde 1:1 mit PBS verdünnt. In sechs 50 ml *Falcon*-Röhrchen (*Greiner bio-one, Cellstar® Tubes*) wurden jeweils 10 ml Lymphozyten-Separationsmedium (*LSM 1077, PAA*) vorgelegt und darauf 30 ml der Blut-Antikoagulanzen-Suspension vorsichtig aufgeschichtet. Anschließend wurden diese 20 Minuten bei 650 x g zentrifugiert. Im Gegensatz zu Knochenmark- und menschlichen Blutproben (s. Abb. 6) entstanden hierbei statt drei nur zwei Schichten (s. Abb. 5), wobei nur die obere Schicht (mononukleäre Zellen) abpipettiert und weiter verarbeitet wurde. Es schlossen sich zwei Reinigungsschritte mit PBS an (10 Minuten bei 650 x g). Das PBS wurde anschließend vorsichtig dekantiert und das verbliebene Pellet wurde in das Nährmedium (Zusammensetzung s. Tab. 1) aufgenommen und in Zellkulturflaschen ausgesät (→ Passage 0). Zuvor wurde die Zellzahl in der *Neubauer* Zählkammer bestimmt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %.



Plasma mit mononukleären Zellen
(Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten und
Thrombozyten)

Pellet mit Erythrozyten und
Granulozyten



Plasma mit mononukleären Zellen
(Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten und
Thrombozyten)

buffy coat

Pellet mit Erythrozyten

Abb.5 Gradient aus peripherem ovinen Blut (die Schicht mit den Monozyten wurde bis zur Erythrozytengrenze vollständig abpipettiert)

Abb.6 Gradient aus peripherem humanen Blut (mod. n. <http://www.chemagen.com/buffy-coat.html>)

Bei vollständiger Konfluenz (ca. am 7. Tag der Kultivierung) wurden die Zellen passagiert, indem das Nährmedium mit PBS ausgewaschen und die Zellen mithilfe von Trypsin (1%)-EDTA (PAA, L11-659) bei 37 °C abgelöst wurden. Ein Teil der Zellen wurde in einer neuen Zellkulturflasche erneut kultiviert (→ Passage 1), um weitere Passagen zu erzeugen. Der Rest wurde für weitere Zellkulturansätze in FBS/10 % DMSO im Stickstofftank bei -80 °C eingefroren. Auf diese Weise wurde in Vorversuchen eine Zellbank aus Zellen verschiedener Schafe und Passagen aufgebaut.

Substanz	Hersteller
DMEM low glucose (1 g/L) ohne L-Glutamin	PAA Lab., Cat.No. E15-005
+ 20 % FBS	PAA Lab., Cat.No. A15-151
+ 1 % (P/S/G)	PAA Lab., Cat.No. P11-013
+ 1 % Amphotericin B	PAA Lab., Cat.No. P11-001

Tab.1 Zusammensetzung des Nährmediums

2.1.2 Zellstimulation

Für einen Versuchsansatz wurden Zellen aus dem Stickstofftank entnommen, angetaut und direkt in ein 50 ml *Falcon*-Röhrchen mit Nährmedium überführt. Anschließend wurden die Zellen in einer T175-Zellkulturflasche (*Greiner bio-one Cellstar® Tissue culture flasks*, Ø 3x10⁴ Zellen/cm²) ausgesät. Alle drei Tage fand ein Inkubationsmediumwechsel statt. Bei 100 %-iger Konfluenz, die nach durchschnittlich sechs Tagen erreicht war, wurden die Zellen mit Trypsin (1 %)-EDTA abgelöst und in der *Neubauer*-Kammer ausgezählt.

Die Zellen wurden nun auf sechs 24er Well-Platten (*Nunc*clontm delta Surface, *NUNC*tm, 1,9 cm²/Well) für immunhistochemische und zytochemische Färbungen sowie sechs Zellkulturflaschen (T75) mit einer Dichte von 200 Zellen pro cm² für insgesamt zwei Kinetikpunkte aufgeteilt (s. Abb. 7). Der Kinetikpunkt 2 wurde für Tag 10 der Stimulation und der Kinetikpunkt 3 für Tag 21 der Stimulation definiert. Für die chondrogene Reihe wurde eine Dichte von 500 Zellen pro cm² gewählt. Das Inkubationsmedium für diese Zellreihe enthielt kein FBS und es hat sich in Vorversuchen gezeigt, dass die Zellen zum Anwachsen eine größere Ausgangsdichte benötigen (Daten nicht aufgeführt). Die unstimulierte Kontrollpopulation wurde mit einer Zelldichte von 200 Zellen pro cm² ausgesät. Das Inkubationsmedium für die Kontrollgruppe entsprach dem Nährmedium aus der Zellaufarbeitung (s. Tab. 1).

Ein Teil der Zellen wurde für die durchflusszytometrischen Analysen am Kinetikpunkt 1 (Tag 0 der Stimulation) verwendet (für eine genauere Beschreibung der Methode s. Kap. 2.2).

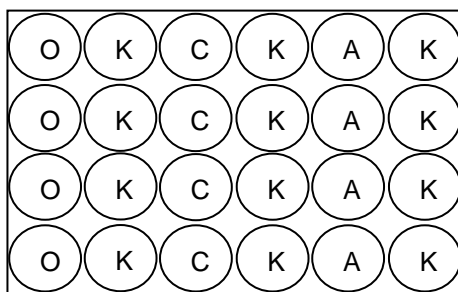


Abb.7 Wellplatte für einen Kinetikpunkt
(O:osteogen stimuliert; A:adipogen stimuliert;
C:chondrogen stimuliert; K:unstimulierte
Kontrolle)

Alle drei Tage fanden ein Inkubationsmediumwechsel (für die Zusammensetzung s. Tab. 2) und mikroskopische Analysen des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung anhand der Zellmorphologie (Mikroskop: *Axiovert 200* und *AxioCam MRC* inkl. Software, *Carl Zeiss*) statt.

50 ml osteogenes Medium		50 ml chondrogenes Medium	
42 ml	DMEM (low glucose) (PAA Lab. E-15-005)	48 ml	DMEM (low Glucose)
7,5 ml	FBS (PAA Lab. A-15-151) Finale Konz. 15 %	500 µl	ITS-Premix (SIGMA I-3146) Finale Konz. 1 %
50 µl	Ascorbinsäure-2-Phosphat (SIGMA A-8960) Finale Konz. 0,1 %	50 µl	Ascorbinsäure-2-Phosphat Finale Konz. 0,1 %
1,0 ml	β-Glycerophosphat (SIGMA G-9891) Finale Konz. 2 %	50 µl	TGF-β1 (SIGMA T-7039) Finale Konz. 0,1 %
500 µl	Dexamethason 10 ⁻⁵ (SIGMA D-4902) Finale Konz. 1 %	500 µl	Dexamethason 10 ⁻⁵ Finale Konz. 1 %
500 µl	P/S/G (PAA Laboratories GmbH) Finale Konz. 1 %	500 µl	P/S/G Finale Konz. 1 %
		500 µl	Pyruvat (SIGMA P-4562) Finale Konz. 1 %
50 ml adipogenes Medium			
45 ml	DMEM (low glucose)		
5 ml	FBS Finale Konz. 10 %		
500 µl	Methylisobutylxanthin (SIGMA I-5879) Finale Konz. 1 %		
225 µl	Insulin (SIGMA I-6634) Finale Konz. 0,45 %		
17,6 µl	Dexamethason 10 ⁻⁵ Finale Konz. 0,035 %		
500 µl	P/S/G Finale Konz. 1 %		
8 µl	Indomethacin (SIGMA I-7378) Finale Konz. 0,01 %		

Tab.2 Zusammensetzung der Inkubationsmedien

2.2 Durchflusszytometrie

Mit dieser Methode ist es möglich einzelne Zellen und andere Partikel zu detektieren, zu messen und zu analysieren. Dies geschieht durch die Messung des absorbierten und reflektierten Lichts und der emittierten Fluoreszenzen, welche beim Durchwandern der Zellen in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laserstrahl vorbei gemessen werden. Durch den Gebrauch spezifischer Antikörper ist es möglich die Expression von Oberflächenmarkern nachzuweisen.

Mithilfe dieser Methode wurde das Ausgangszellmaterial am Tag 0 der Stimulation (Kinetikpunkt 1) typisiert und der Anteil der MSC bestimmt. Verwendet wurden Antikörper gegen CD44 (H-CAM), CD105 (Endoglin), CD73 und CD90 (Thy-1), die als positive Selektionsmarker gelten, sowie Antikörper gegen die hämatopoetischen Marker CD45, CD34 und CD14 (Monozyten) als wichtige negative Selektionsmarker (s. Tab. 3) (Dominici et al., 2006; Fischer, 2008).

Antikörper	Markierung	Typ	Hersteller	Artikel-Nr.
hCD34	FITC	IgG1	<i>AbD Serotec</i>	MCA547F
oCD45	RPE	IgG1	<i>AbD Serotec</i>	MCA2220PE
hCD14	FITC	IgG1	<i>BeckmannCoulter</i>	IMO645U
oCD45	RPE	IgG1	<i>AbD Serotec</i>	MCA2220PE
oCD45	FITC	IgG1	<i>AbD Serotec</i>	MCA2220F
hCD73	RPE	IgG1		550257
Isotyp Kontrolle	FITC RPE	IgG1	<i>BeckmannCoulter</i>	A07794
oCD44	FITC	IgG1	<i>AbD Serotec</i>	MCA2219F
oCD45	RPE	IgG1	<i>AbD Serotec</i>	MCA2220PE
hCD105	FITC	IgG1	<i>Ancell</i>	326040
oCD45	RPE	IgG1	<i>AbD Serotec</i>	MCA2220PE
oCD45	FITC	IgG1	<i>AbD Serotec</i>	MCA2220F
hCD90	RPE	IgG1	<i>BeckmannCoulter</i>	555596
Propidiumiodid	-	-	<i>AbD Serotec</i>	51-66211E
Draque 5	-	-	<i>BeckmannCoulter</i>	BS3/03

Tab.3 Durchflusszytometrieprotokoll (Abk.: o:anti-ovine; h:anti-human)

Pro Ansatz wurden ca. 100.000 Zellen verwendet, die zunächst mit 3 ml FACS-Puffer (s. Tab. 4) bei 1800 RPM für 10 Minuten gewaschen werden. Jedes Zellpellet wurde mit 50 µl FACS-Puffer resuspendiert und es wurden 2 µl des jeweiligen Antikörpers (s. Tab. 3) dazu pipettiert. Aufgrund der höheren Konzentration wurde die Isotypkontrolle auf 1 µl reduziert. Die beiden Antikörper in einem Ansatz sind mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und konnten daher in zwei separaten Kanälen (F1, F2) detektiert werden. Die Inkubationsdauer betrug 20 Minuten bei 0 °C. Anschließend wurden zu jedem Ansatz jeweils 1 µl Propidiumiodid und Draque 5 als Vitalitätsnachweis hinzugefügt. Nach weiteren 5 Minuten Inkubationszeit wurden die Ansätze mit jeweils 2 ml FACS-Puffer 10 Minuten lang zentrifugiert. Die Zellen wurden in 300 µl Formalin-Lösung (s. Tab. 4) fixiert und bis zu der Messung bei 4 °C aufbewahrt. Die Messungen wurden in einem *Cytomics FC 500* Durchflusszytometer (*Beckman Coulter*) im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software *Kaluza 1.1* (*Beckman Coulter*).

50 ml FACS-Puffer		5 ml Formalin-Lösung	
48 ml	Isotone® II Diluent (<i>Beckman Coulter</i> ®, Art.Nr. 8448011)	4,5 ml	FACS-Puffer
2 ml	FBS (PAA, A-15-151) Finale Konz. 4 %	0,5 ml	Formaldehyd (<i>Carl Roth GmbH</i> <i>Roti</i> ®-Histofix 4 %, Art.Nr. P087.3) Finale Konz. 0,4 %

Tab.4 Lösungen für die durchflusszytometrische Färbung

2.3 Immunzytochemische Färbungen

Mithilfe der immunzytochemischen Färbungen lassen sich gewebs- und kompartimentspezifische Proteine (Antigene) sichtbar machen. Dazu wurden die Zellen in den Wells erst mit 4 %-igem Formaldehyd 10 Minuten lang fixiert und anschließend mit 1 %-igem Wasserstoffperoxid für 20 Minuten vorbehandelt. Die endogene Peroxidase wurde damit blockiert um Hintergrundfärbungen zu verhindern.

Bei der indirekten Methode handelt es sich um ein zweifaches Antikörpersystem: Im ersten Schritt wurde der Primärantikörper (s. Tab. 6), welcher sich gegen das gesuchte Antigen bzw. dessen Epitop richtet, aufpipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C im Dunkeln. Im zweiten Schritt wurde der Sekundärantikörper (s. Tab. 6) aufgetragen, der gegen die artspezifische Immunglobulinkette des Primärantikörpers gerichtet und biotinyliert ist. Die Inkubation dauerte eine Stunde bei 30 °C im Dunkeln. Im dritten Schritt wurde bei der LAB (=Labelled Avidin-Biotin)-Methode ein Avidin-(Meerretich-)Peroxidase-System eingesetzt. Das Avidin ist ein Glykoprotein mit einer hohen Affinität (10^{15} M^{-1}) zum Biotin, für das es vier Bindungsstellen besitzt. Damit stellt es ein sicheres und sensitives Detektionssystem dar, da sowohl die Sekundärantikörper als auch die Peroxidase mit mehreren Biotinmolekülen konjugiert sind. Die Dauer der Inkubation betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur. Im letzten Schritt wurden als Substrat-Chromogen-Gemisch das 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und Urea hinzugegeben und unter dem Mikroskop kontrolliert. Die freiwerdenden Protonen oxidierten das farblose Chromogen zum braunen Endprodukt. Im Anschluss erfolgte eine Kerngegenfärbung mit der *Meyers Hämalaun*-Lösung über 5 Minuten. Die gefärbten Wells wurden mit 3-4 Tropfen *CC/Mount*™ eingedeckt. Für die verwendeten Chemikalien s. Tabelle 5.

Material und Konzentration	Bezugsfirma/Herstellung
Dulbecco's PBS-Puffer ohne Ca & Mg	<i>PAA Lab. GmbH Cat.No. H15-002</i>
4 % Formaldehyd (säurefrei, pH7, phosphatgepuffert)	<i>Carl Roth GmbH Art.Nr. P087.3</i>
H ₂ O ₂ /PBS → Finale Konz. 1 %	<i>Carl Roth GmbH, Art.Nr. 9681.1</i>
PBSTA	PBS plus 0.05% <i>Triton</i> ® X-100 (<i>Merck GmbH</i> , Art.Nr. 648462) plus 2 % normal-gt/-rb-Serum pH 7.5 (<i>Vector S-1000/5000</i>)
ABC-Kit	<i>Vector Vectastain</i> ® <i>Elite (Universal)</i> <i>PK-6200</i>
DAB-Urea-Set	<i>SIGMA D-4418</i>
Mayers Hämalaun/Aqua dest. → Finale Konz.10 %	<i>Merck GmbH, Art.Nr. 109249</i>
Aqueous Mounting Medium (<i>CC/Mount</i> ™)	<i>SIGMA C-9368</i>

Tab.5 Bei der Immunzytochemie verwendete Substanzen

Primärantikörper	Klon	Hersteller	Konzentration
polykl. Ziege Anti-Osteocalcin	--	<i>Santa Cruz</i> <i>Sc 18319</i>	1:200
polykl. Ziege Anti-Rank	--	<i>Santa Cruz</i> <i>Sc 7624</i>	1:200
polykl. Kaninchen Anti-Adiponectin	--	<i>Acris</i> <i>SP2182P</i>	1:250
polykl. Kaninchen Anti-PPAR gamma	--	<i>Sigma</i> <i>P0744</i>	1:250
monokl. Maus Anti-Cartilage Proteoglycan	EFG-4	<i>Chemicon</i> <i>MAB 2015</i>	1:100
monokl. Maus Anti-Collagen II	6B3	<i>Chemicon</i> <i>MAB8887</i>	1:100
Sekundärantikörper			
polykl. Ziege Anti-Maus-IgG biotinyliert	--	<i>Vector</i> <i>BA-9200</i>	1:200
polykl. Ziege Anti-Kaninchen-IgG biotinyliert	--	<i>Vector</i> <i>BA-1000</i>	1:200
polykl. Kaninchen Anti.Ziege-IgG biotinyliert	--	<i>Vector</i> <i>BA-5000</i>	1:200
Negativkontrollen			
normal goat IgG		<i>Calbiochem</i> <i>NI02</i>	1:200
normal rabbit IgG		<i>Calbiochem</i> <i>NI01</i>	1:1250
normal mouse IgG		<i>Biozol</i> <i>I-2000</i>	1:100

Tab.6 Verwendete Antikörper

Die günstigste Antikörperversdünung wurde in Vorversuchen mit einer Verdünnungsreihe, die sich an der vom Hersteller vorgeschlagenen Konzentration orientierte, ermittelt. Zum Ausschluss einer unspezifischen Farbreaktion wurden Negativkontrollen (s. oben) mit dem Ausschluss des Primärantikörpers bei sonst identischer Färbeprozedur durchgeführt.

2.4 Histologische Färbungen

2.4.1 Ölrot O

0,5 g Ölrot O-Pulver (*Waldeck, Color-Index 26125*) wurde in 100 ml 99 %igem Isopropylalkohol gelöst. Sechs Teile der Stammlösung wurden mit vier Teilen *Aqua dest* gemischt, 24 Stunden stehen gelassen, filtriert und auf die fixierten Wells aufgetragen. Die Inkubationsdauer betrug 10 Minuten. Anschließend wurden die Wells mit *Aqua dest* gespült. Die Kernfärbung erfolgte mit der *Meyers Hämalaun-Lösung* (ca. 2 Minuten). Anschließend erfolgte nochmals die Spülung der Wells mit *Aqua dest* und zum Schluss das Eindecken mit *CC/Mount™*.

Die intrazellulären Lipide färbten sich kräftig rot an, die Kerne blau-violett.

2.4.2 Alizarin rot

0,5 % Alizarinrot S (*Merck Certistane®*, K00402529027) wurde in Puffer (pH 9,0 und pH 7,0) gelöst. Die pH 9,0-Färbelösung wurde eine Stunde auf den fixierten Wells inkubiert und mit der jeweiligen Pufferlösung abgespült. Die Inkubationsdauer für die pH 7,0-Färbelösung betrug fünf Minuten und wurde mit jeweiliger Pufferlösung abgespült. Die Wells wurden mit *CC/Mount™* eingedeckt.

Alizarin S formt mit zweiwertigen Kationen (u.a. Ca^{++}) Chelatverbindungen. Kalziumsalze färbten sich intensiv orange bis gelbrot.

2.4.3 Alkalische Phosphatase

Das Substrate Kit III (*Vector® SK-5300*) wurde in 5 ml 1M Tris-Puffer pH 8 (*Ambion AM9855G*) gelöst, auf die fixierten Wells aufgetragen und 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Die Wells wurden mit *CC/Mount™* eingedeckt. Es erfolgte eine Kernfärbung mit *Mayers Hämalaun* (ca. 1 Minute) oder Kernechtrot (0,5-1 Minute).

Alkalische Phosphatase (AP) gehört zu einer Enzymgruppe, welche bei alkalischen pH-Wert verschiedenste Moleküle dephosphoryliert. Im Menschen kommt sie in mindesten 15 Isoenzymen vor. Durch unterschiedliche Glykosylierung entstehen Gruppen gewebespezifischer Isoenzyme, u.a. die Knochen-AP, welche vermehrt von aktiven Osteoblasten freigesetzt wird (Thomas, L.). Sie wurde in diesem Versuch türkisblau angefärbt.

2.4.4 Alcianblau PAS

Fertige Alcianblau-Lösung (*Waldeck GmbH, Art.Nr. 2C-005*) wurde fünf Minuten auf den fixierten Wells inkubiert und anschließend mit Leitungswasser ausgewaschen und mit *Aqua dest* ausgespült.

Die Inkubationsdauer für die Periodsäure (*Merck, Art.Nr. 101646.1*) und das Schiff's Reagenz (*Merck, Art.Nr. 101646.2*) betrug jeweils 10 bzw. 15 Minuten. Anschließend erfolgte das Spülen mit Leitungswasser und mit *Aqua dest*.

Hämatoxylin Lösung modifiziert nach Gill III (*Merck, Art.Nr. 105174*) wurde 20 Sekunden auf den Wells inkubiert und mit Leitungswasser abgespült. Die Wells wurden mit *CC/Mount™* eingedeckt.

Durch die Behandlung mit Periodsäure werden die 1,2-Glykole zu Aldehydgruppen oxidiert, welche mit Schiff's Reagenz eine leuchtend rote Farbe ergeben. Polysaccharide und neutrale Mukopolysaccharide werden purpurfarben dargestellt. Glykosaminoglykane, welche typischerweise im Knorpel vorkommen, färben sich mithilfe des Alcianblau hellblau bis türkis an. Kerne sind dunkelblau.

2.4.5 Safranin O

Ein Gramm Safranin O-Pulver (*Sigma, S-8884*) wurde in 100 ml 96 %-igem Ethanol (*Merck, Art.Nr. 1.08543.0250*) gelöst (1 %-ige Lösung) und filtriert. Die Lösung wurde fünf Minuten auf den Wells inkubiert. Anschließend wurde mehrmals mit PBS gespült und die Wells mit *CC/Mount™* eingedeckt.

Das Safranin O färbte das Chondroitinsulfat je nach Konzentration rosa-rot.

2.5 Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR dient dem spezifischen Nachweis einer Genexpression. Die mRNA wird aus der Zelle isoliert und zuerst von der Reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) in komplementäre cDNA umgeschrieben. Diese dient als Ausgangsmaterial für die PCR. Als Resultat liegt die gesuchte Sequenz in zahlreichen Kopien vor und kann mithilfe der Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Hierfür wird eine thermoresistente DNA-Polymerase verwendet, welche aus dem Einzel- einen Doppelstrang synthetisiert. Dieser wird in jedem Schritt zur erneuten Amplifikation wieder denaturiert. Zur Initiation der Synthese braucht die DNA-Polymerase Oligonukleotide (Primer), welche zum 3'- bzw. 5'-Ende der gesuchten Sequenz komplementär sind und somit den Anfang und das Ende der zu amplifizierenden Sequenz begrenzen.

2.5.1 RNA-Isolation

Die stimulierten Zellkulturen wurde nach der Trypsinablösung in 350 µl Guanidinisothiocyanat enthaltenden RLT-Puffer (*QIAGEN, Mat.No. 1015762*) inkl. 1 % β-Mercaptoethanol (*Fluka Biochemika, Art.Nr. 63689*) aufgenommen und bei 80 °C archiviert. Der RLT-Puffer lysiert die Zellen, inaktiviert sofort die unspezifischen RNasen und stabilisiert das RNA-Material.

Zur Isolierung der RNA wurde das RNeasy MINI-Kit von *QIAGEN*® entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet (RNeasy Mini Handbuch 04/2002): Die Proben wurden auf eine Biopolymer-Shredding-Säule (Qiashredder) pipettiert und in einem Zentrifugationsschritt homogenisiert. Für optimale Bindungsbedingungen wurden anschließend 350 µl 70 %-iges Ethanol hinzugegeben. Die Lysate wurden auf eine RNeasy-Spinsäule aufgetragen und erneut zentrifugiert (>8000 x g), dabei wurde die Gesamt-RNA von der Silicagel-Membran adsorbiert. Mögliche Kontaminationen wurden anschließend durch mehrere Waschvorgänge mit jeweils 350 µl RW1- und 500 µl RPE-Puffer entfernt. Nach dem ersten Waschvorgang mit RW1-Puffer wurde ein DNase-Verdau (RNase freies DNase Set) durchgeführt, wodurch mögliche Verunreinigung durch DNA entfernt wurden. Die Gesamt- RNA wurde anschließend mit 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Diesem Eluat wurde 1 µl RNasin® zugesetzt. Die

Konzentrationsbestimmung erfolgte aus einer 1:10 Verdünnung (10 µl RNA + 90 µl RNase freies Wasser).

Die RNA-Menge wurde mit einem Biophotometers mit angeschlossenenem Drucker (*Eppendorf*) gemessen. Zum Einsatz kamen je Primer 40 ng/µl RNA.

2.5.2 PCR-Ansatz

Zuerst wurde folgender Mastermix aus dem *QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit* zusammengestellt (die Menge des Mastermix ist abhängig von der Anzahl der Proben und Primer):

3' Primer 20 pmol	1 µl
5' Primer 20 pmol	1 µl
RNasin 1:4	1 µl
Enzym-MIX	1 µl
dNTP-Mix 10 mM	1 µl
5 x RT-PCR-Buffer	5 µl
5 x Q-Solution	5 µl
RNA	X µl
RNase-freies Wasser	X µl

Tab.7 PCR-Mastermix

Je Probe wurden 23-24 µl Mastermix in einen 0,2 ml Thermo-Strip vorgelegt. Anschließend wurde je Probe 1 µl des entsprechenden 3' und 5' Primer zugegeben. Es folgte die Zugabe der entsprechenden RNA-Menge von 40 ng/µl je Primer (0,1-2 µl). Folgende spezifische Primer wurden in „*NBCI Entrez*“ (Database: Gene) entsprechend den Empfehlungen des „Technical Tip“ von *Roche®* designed und von *Thermo Electron GmbH* synthetisiert:

Ovis aries aggrecan interglobular domain

(Locus AF019758.1)

Sequence (5'→3')

Forward primer CGAGGAAGACATCACCATCC Plus

Reverse primer TAAGGTCACCTGCACGACG Minus

Ovis aries strain Warhill type I collagen alpha 1 precursor

(Locus AF129287.1)

Sequence (5'→3')

Forward primer CACCAGTCACCTGCGTACAG Plus

Reverse primer GAGACCACGAGGACCAGAAG Minus

Ovis aries glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

(Locus AF030943.1)

Sequence (5'→3')

Forward primer ATGCTGGTGCTGAGTACGTG Plus

Reverse primer CCCAGCATCGAAGGTAGAAG Minus

Ovis aries peroxisome proliferator activated receptor gamma 1 protein

(Locus NM_001100921.1)

Sequence (5'→3')

Forward primer AGCGTCAGGGTTCCACTATG Plus

Reverse primer ATGTCCTCAATGGGCTTCAC Minus

Ovis aries bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein

(Lokus NM_001040009.1)

Sequence (5'→3')

Forward primer AGGCAGATGCAAAGCCTG Plus

Reverse primer GTCCTGGAGAGAAGCCAGAG Minus

In dem *Mastercycler gradient* (Eppendorf) fand die Polymerase Kettenreaktion nach folgendem Schema statt:

1. 94 °C/30 Min. (Denaturierung der Ausgangssequenz)
2. ca. 55 °C/30 Min. (Annealing, exakte Temperatur abhängig vom GC-Gehalt der Primer)
3. 72 °C/60 Min (Elongation des zweiten Stranges)

Zurück zum 1. Schritt und Wiederholung über 35 Zyklen.

4. 72 °C/60 Min. (Endelongation)

Lagerung bei 4 °C über Nacht oder länger bei -20 °C.

2.5.3 Gelelektrophorese

Im Anschluss an die PCR wurden den Proben jeweils 3 µl Ladepuffer (s. Tab. 8) hinzugefügt. Davon wurden 20 µl je Probe in eine Tasche des Agarose-Gels (1,4 %-ige Agarose [Sea Kem® Cambrex, Cat.No. 5004] in TAE-Puffer) pipettiert. Unter dem Einfluss des elektrischen Feldes (110 V für 2,5 Std., C.B.S. Scientific, SGU-020T-02) wanderten die Proben durch das Gel, vom Minus- zum Pluspol. Dabei wandern kleinere Moleküle schneller als größere durch das Gel. Mit Hilfe einer DNA-Leiter (100 bp äquimolar der Fa. Roth) konnte die Molekülgröße bestimmt und somit die Banden untereinander differenziert werden. Anschließend wurden die Proben mit einer 1 %-igen Ethidiumbromidlösung (Carl Roth, Art.Nr. 2218.2) im TAE-Puffer für fünf Minuten im Dunkeln gefärbt. Dabei handelt es sich um einen roten Phenanthridin-Farbstoff, der mit Nukleinsäuren interkaliert, sein Absorptionsspektrum verändert und die Intensität der Fluoreszenz-Emission steigert. So konnten die DNA-Banden unter einer UV-Lichtquelle sichtbar gemacht und abfotografiert werden (System Alpha DigiDoc von Biozym inkl. Software).

Chemikalien	Hersteller, Artikelnummer
25 g D(+)-Saccharose	Carl Roth, Art.Nr. 4621.1
25 ml TAE-Puffer	Eppendorf, Lot. V1053741
eine Spatelspitze Orange G	Merck, K91446025

Tab.8 Zusammensetzung des Ladepuffers für die Gelelektrophorese

2.6 Herstellerangaben

Im Text angegebene Hersteller:

Greiner Bio-One GmbH
Maybachstrasse 2
D-72636 Frickenhausen

PAA Laboratories GmbH
Unterm Bornrain 2
D-35091 Cölbe

Thermo Electron LED GmbH (NUNC™)
Robert-Bosch-Straße 1
D-63505 Langenselbold

Eppendorf AG
Barkhausenweg 1
D-22339 Hamburg

Beckman Coulter GmbH
Europark Fichtenhain B 13
D-47807 Krefeld

Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Riedstraße 2
D-89555 Steinheim

CARL ROTH GMBH + CO. KG
Schoemperlenstr. 1-5
D-76185 Karlsruhe

Biozym Scientific GmbH
Steinbrinksweg 27
D-31840 Hessisch Oldendorf

Enzo Life Sciences (Ancell™, Vector)
Marie-Curie-Strasse 8
Lörrach DE-79539

Merck KGaA (Calbiochem®)
Frankfurter Straße 250
D-64293 Darmstadt

Acris Antibodies GmbH
Schillerstraße 5
D-32052 Herford

Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Bergheimer Str. 89-2
D-69115 Heidelberg

BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH
Obere Hauptstrasse 10b
D-85386 Eching

Millipore GmbH (Chemicon)
Am Kronberger Hang 5
D-65824 Schwalbach/Ts.

Waldeck GmbH & Co KG
Havixbeckerstr.62
D-48161 Münster

Cambrex IEP
Rheingaustrasse 190-196
D-65203 Wiesbaden

Fluka Chemie AG
Industriestrasse 25
9471 Buchs-Switzerland

QIAGEN GmbH
Qiagen Strasse 1
D-40724 Hilden

VWR International GmbH
(C.B.S. Scientific)
Hilpertstrasse 20a
D-64295 Darmstadt

Beckman Coulter GmbH
Europark Fichtenhain B 13
D-47807 Krefeld

MorphoSys AbD GmbH t/a AbD Serotec
Münsterstr. 306
D-40477 Düsseldorf

Life Technologies GmbH (Ambion®)
Frankfurter Straße 129B
D-64293 Darmstadt

Ratiopharm GmbH
Graf-Arco-Str. 3
D-89079 Ulm

Carl Zeiss AG
Carl-Zeiss-Straße 22
D-73447 Oberkochen

Im Text nicht angegebene Hersteller:

accu-jet® pro Pipettierhelfer

BRAND GMBH + CO KG
Otto-Schott Str. 25
D-97877 Wertheim

Sicherheitswerkbank Heraeus®
HERAsafe® KS

Thermo Fisher Scientific
Germany Ltd. & Co. KG
Perbio Science Deutschland
Adenauerallee 113
D-53113 Bonn

Handschuhe
Micro-Touch Nitra-Tex® 240 mm

Ansell GmbH
Stadtquartier Riem Arcaden
Lehrer-Wirth-Str. 4
D-81829 München

Wasseraufbereitungsanlage

ELGA LabWater

Purelab plus®

VWS Deutschland GmbH

Lückenweg 5

D-29227 Celle

CO₂-Inkubator

BINDER GmbH

Im Mittleren Ösch 5

D-78532 Tuttlingen

Zentrifuge

Eppendorf AG

5810 R

(Anschrift s. oben)

3 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, mesenchymale Progenitorzellen im peripheren ovinen Blut nachzuweisen und deren Verhalten bei osteogener, chondrogener und adipogener Inkubation im Vergleich zu einer unstimulierten Zellkultur zu untersuchen. Die Untersuchungen wurden jeweils am Tag 0, Tag 10 und Tag 21 der Inkubation durchgeführt. Zudem wurden diese Zellpopulationen mit zwei ovinen USSC-Kulturen verglichen.

3.1 Durchflusszytometrische Analyse

Mithilfe der Durchflusszytometrie erfolgten der Nachweis der MSC und die Bestimmung ihres Anteils an der mononukleären Zellpopulation vor Beginn der Stimulation. Eine Messreihe aus verschiedenen Passagen des peripheren Blutes (PB) wurde erstellt und mit der 3. Passage der Nabelschnurblutzellen (CB) verglichen.

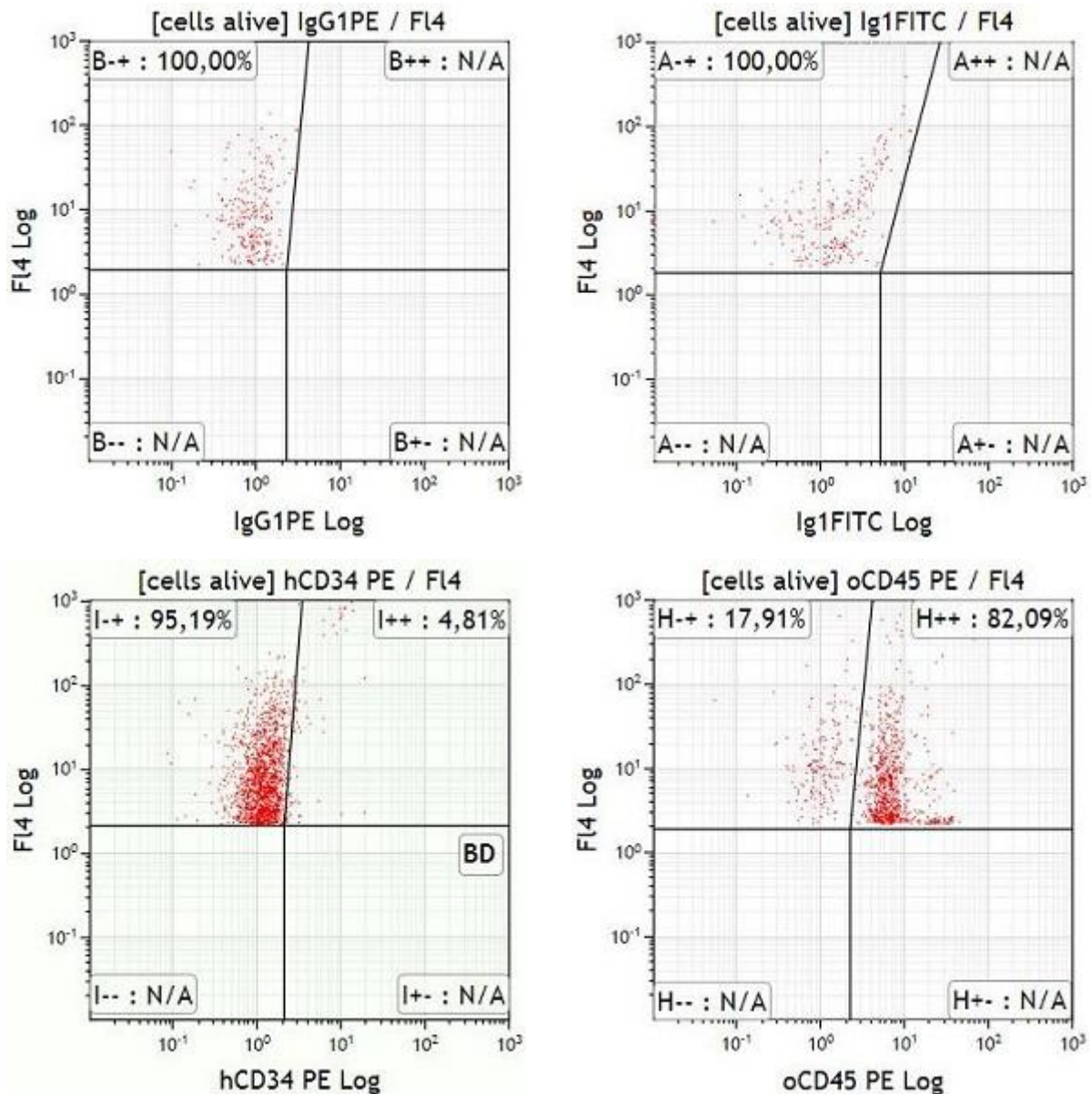
3.1.1 Zusammenfassung Durchflusszytometrie

The International Society for Cellular Therapy definierte im Jahr 2006 die Anforderungen an den Nachweis von humanen multipotenten MSC (Dominici et al., 2006). Diese beinhalten die Plastikadhärenz unter Zellkulturbedingungen, eine fibroblastoide Morphologie und die Fähigkeit zu der *in vitro*-Differenzierung zu Adipozyten, Osteoblasten und Chondroblasten. Hinzu kommen die Expression der Oberflächenmarker CD105, CD73, CD90 und CD44 und das Fehlen von CD14, CD45 und CD34 (Bobis et al., 2006; Fischer, 2008).

In sämtlichen getesteten Passagen der ovinen PB- und CB-Zellpopulationen ließen sich CD105-, CD90- und CD44-positive Zellen nachweisen. Eine eindeutige Zu- oder Abnahmetendenz mit steigender Passagezahl ließ sich bei teils starken interindividuellen Abweichungen im Antigenmuster, auch innerhalb einer Passage, nicht feststellen. Im Vollblut war der Anteil der Zellen mit hämatopoetischem und monozytären Expressionsmuster (CD34, CD45, CD14) zu Beginn noch relativ hoch und nahm mit steigender Passagezahl ab. Sowohl der Anteil der CD105- und CD90-

postiven Zellen als auch der Zellen mit hämatopoetischem Expressionsmuster fiel in der Passage 3 der CB-Population höher aus als in der entsprechenden Passage der PB-Population (s. Tab. 9).

Im Folgenden sind repräsentative durchflusszytometrische Ergebnisse aus jeder analysierten Passage dargestellt (s. Abb. 8-12):



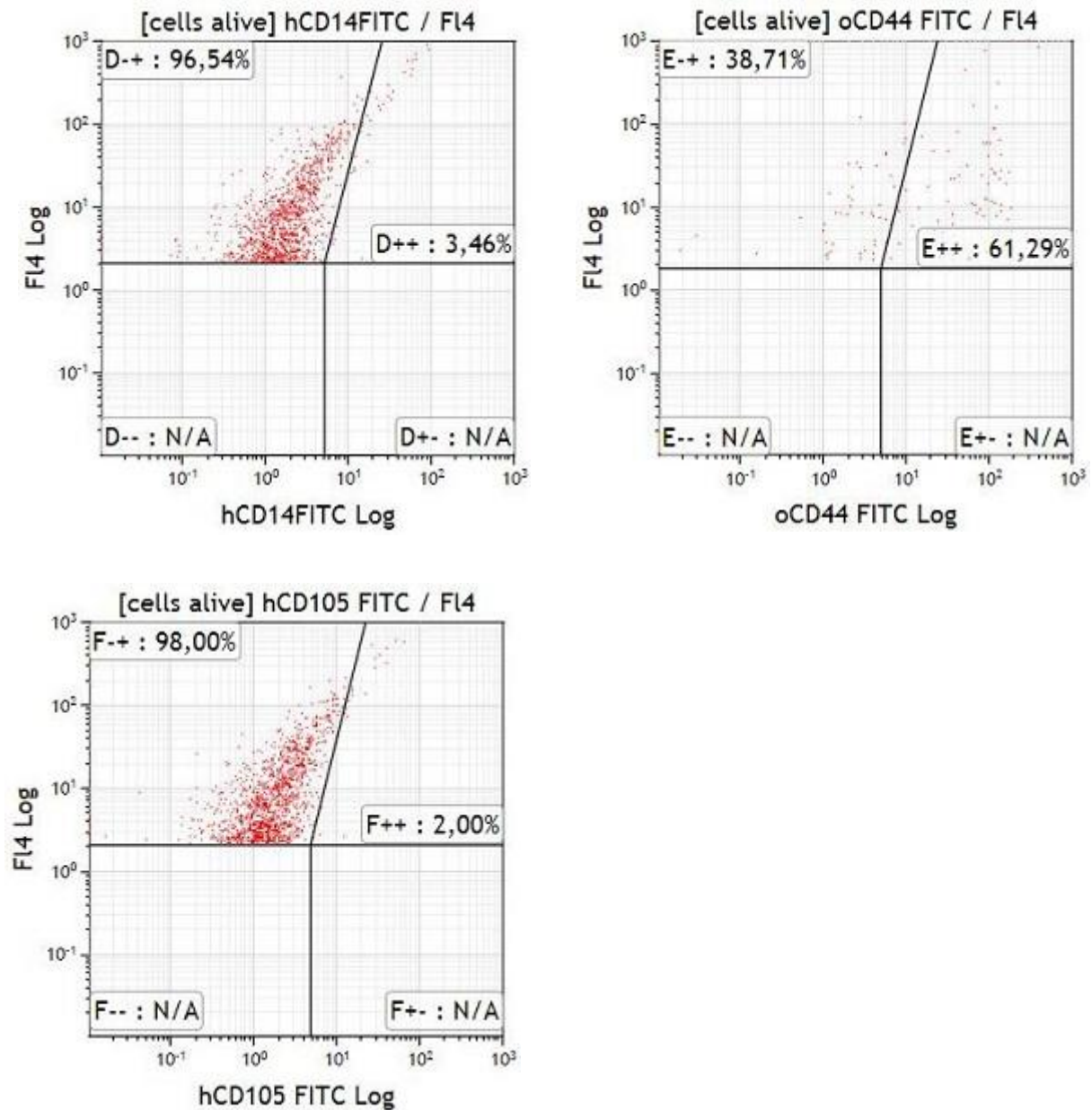
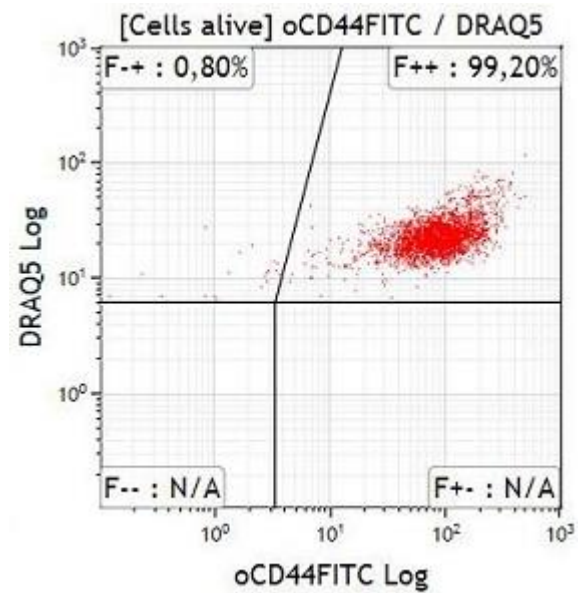
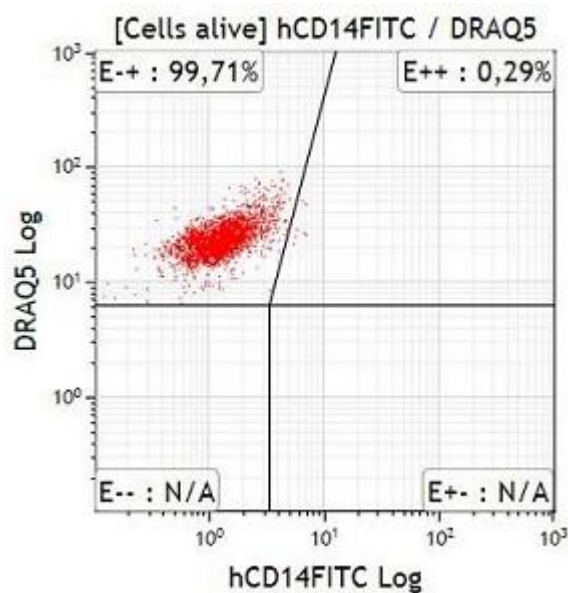
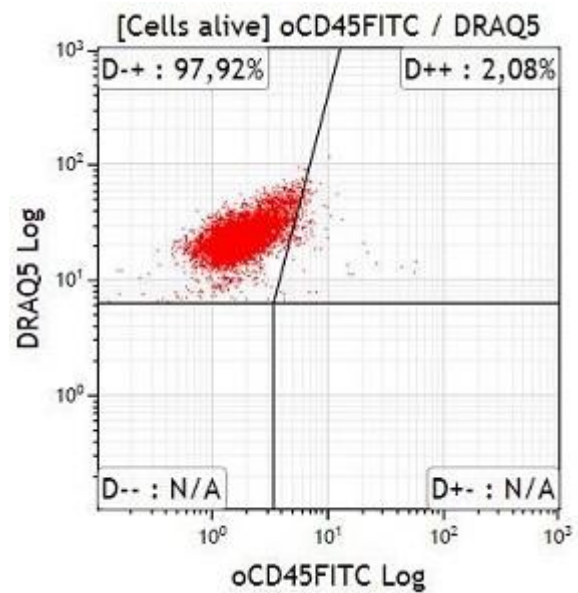
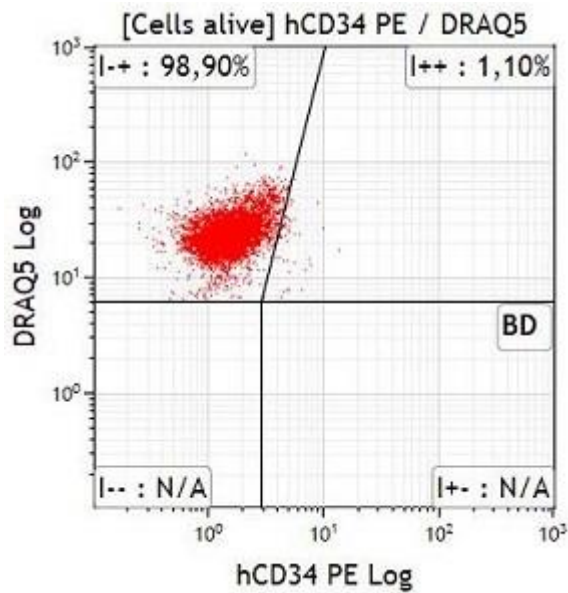
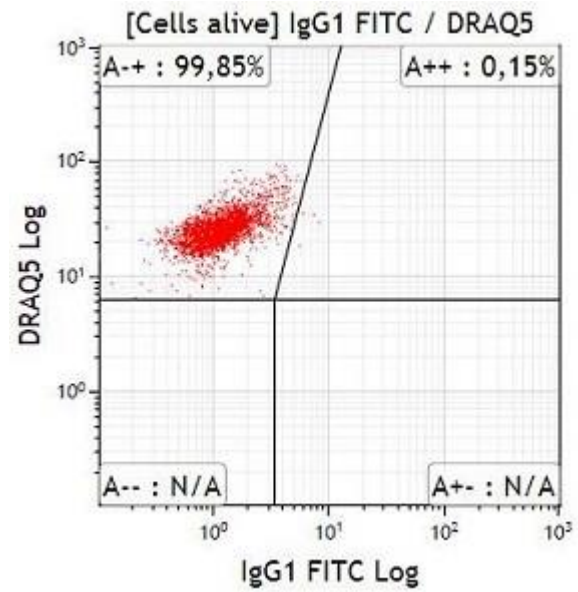
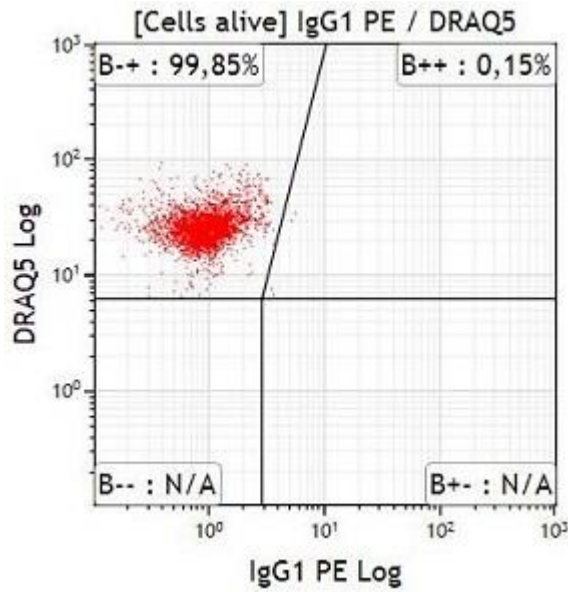


Abb.8 Dot-Plot-Darstellung der auf Vollblutzellen (Schaf 4) gemessenen CD-Marker. Analysefenster: vitale Zellen; x-Achse: antikörpermarkierte Zellen; y-Achse: DRAQ5-markierte Zellen; die Achsenausrichtung zur Bestimmung des Anteils an spezifisch markierten Zellen erfolgt anhand der Negativkontrollen IgG1 FITC/PE (s. erste Reihe). Zu dem Testzeitpunkt noch kein CD90-Antikörper verfügbar.



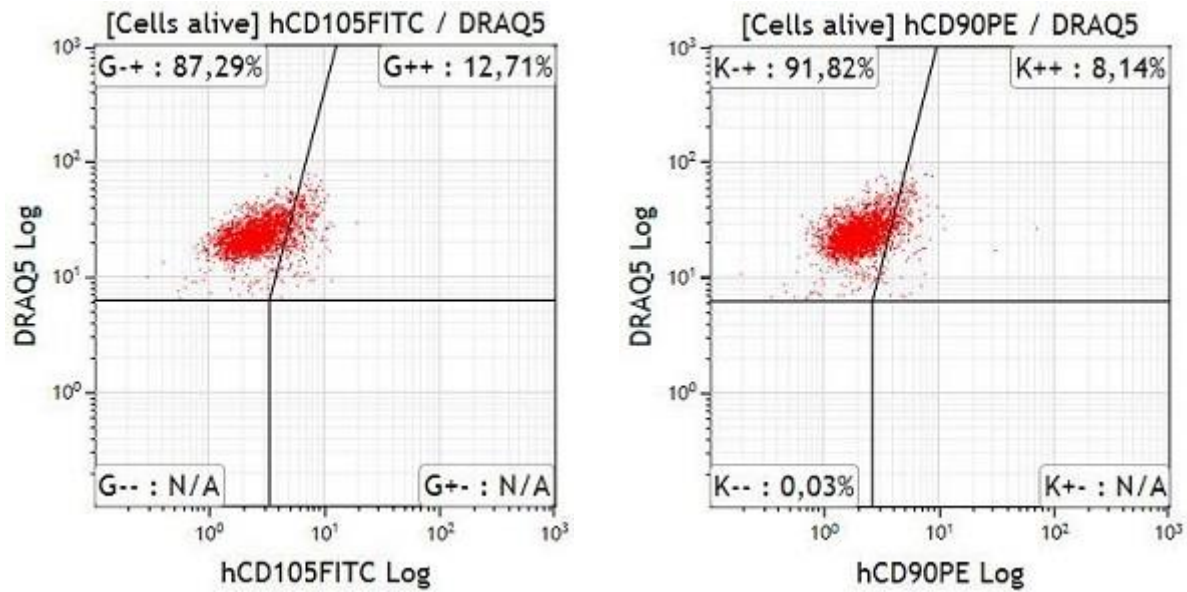
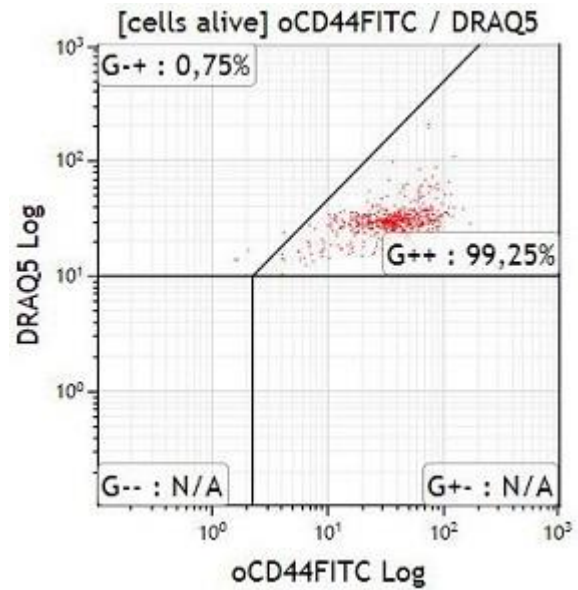
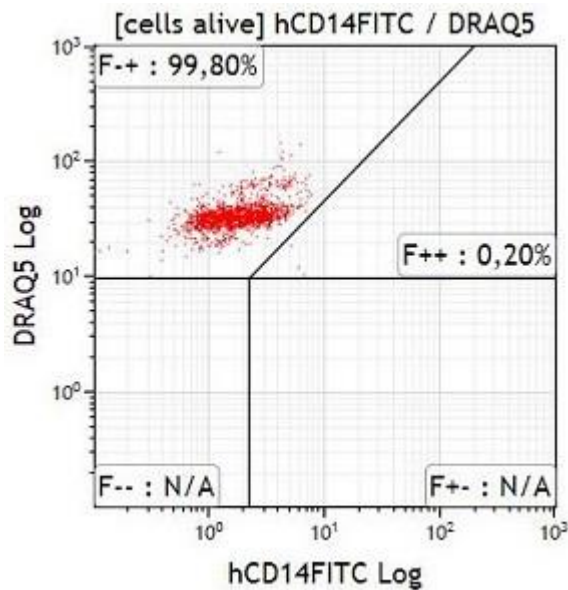
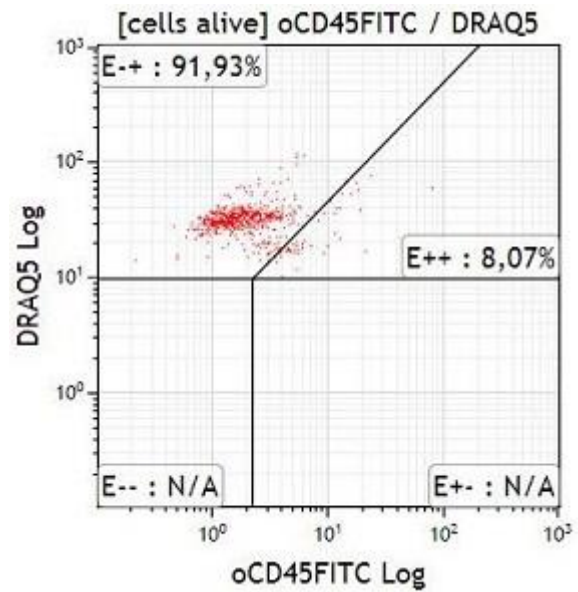
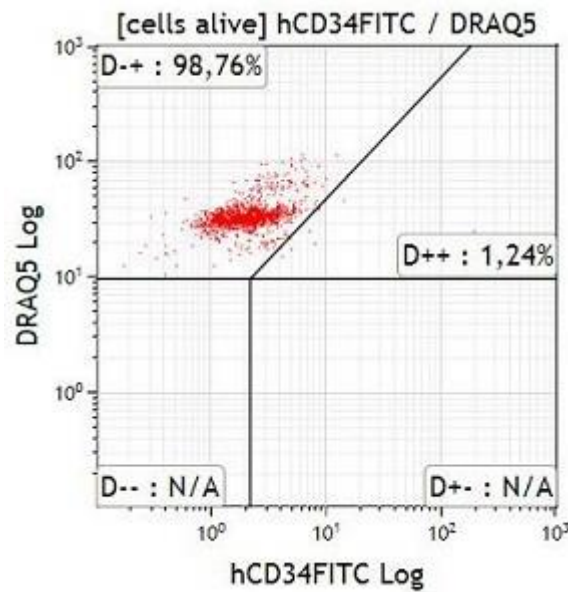
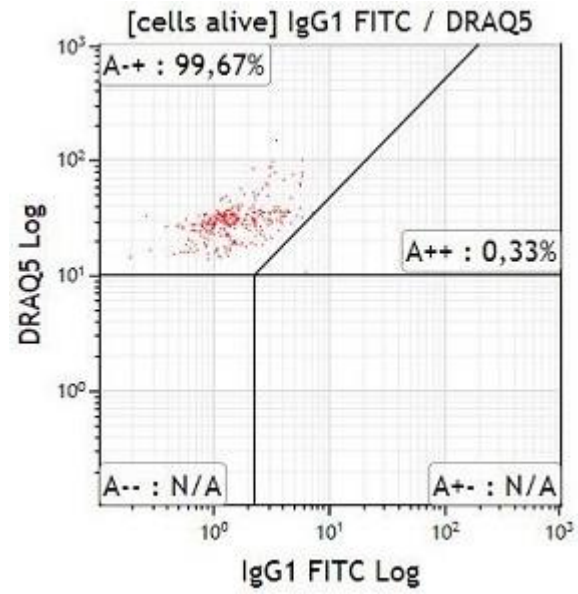
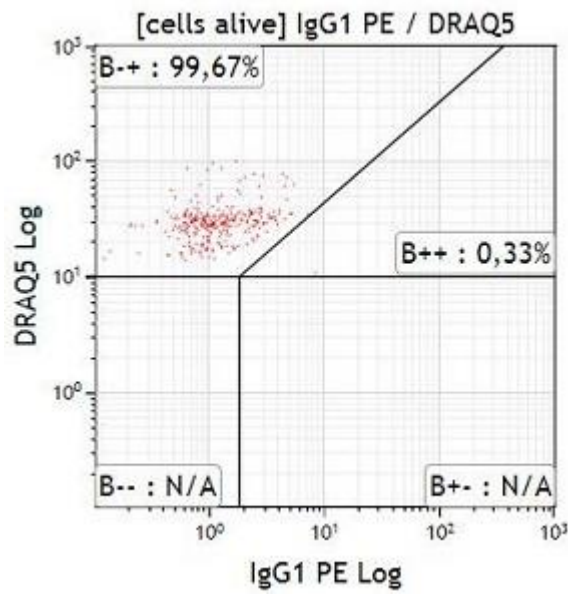


Abb.9 Dot-Plot-Darstellung der auf den P0-Zellen (Schaf 8) gemessenen CD-Marker; Analysefenster: vitale Zellen; x-Achse: antikörpermarkierte Zellen; y-Achse: DRAQ5-markierte Zellen; die Achsenausrichtung zur Bestimmung des Anteils an spezifisch markierten Zellen erfolgt anhand der Negativkontrollen IgG1 FITC/PE (s. erste Reihe).



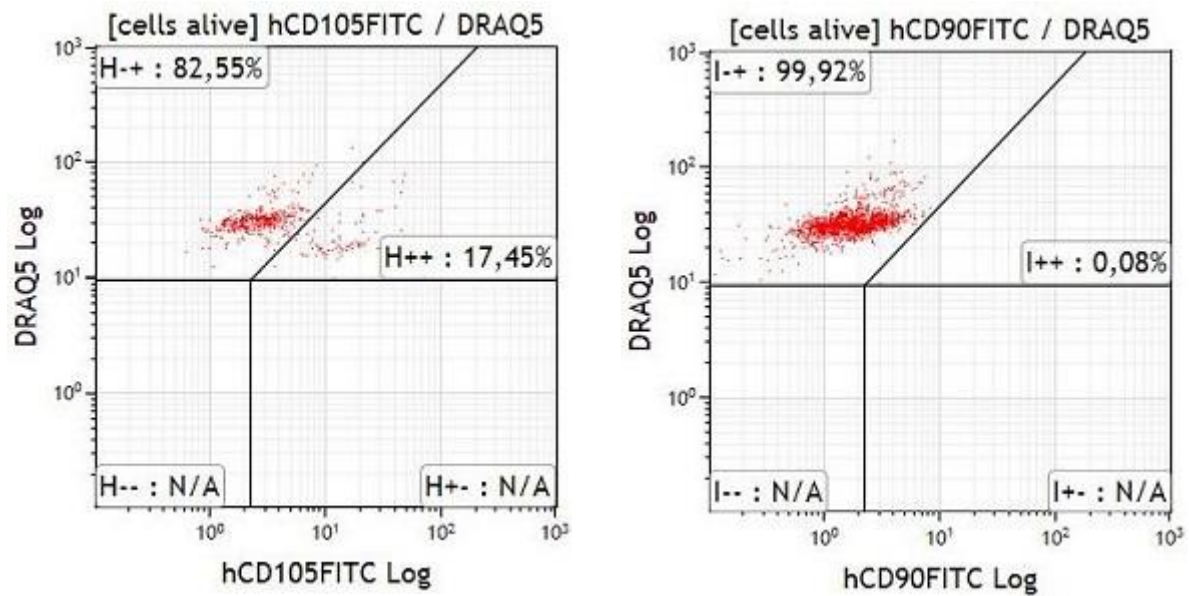
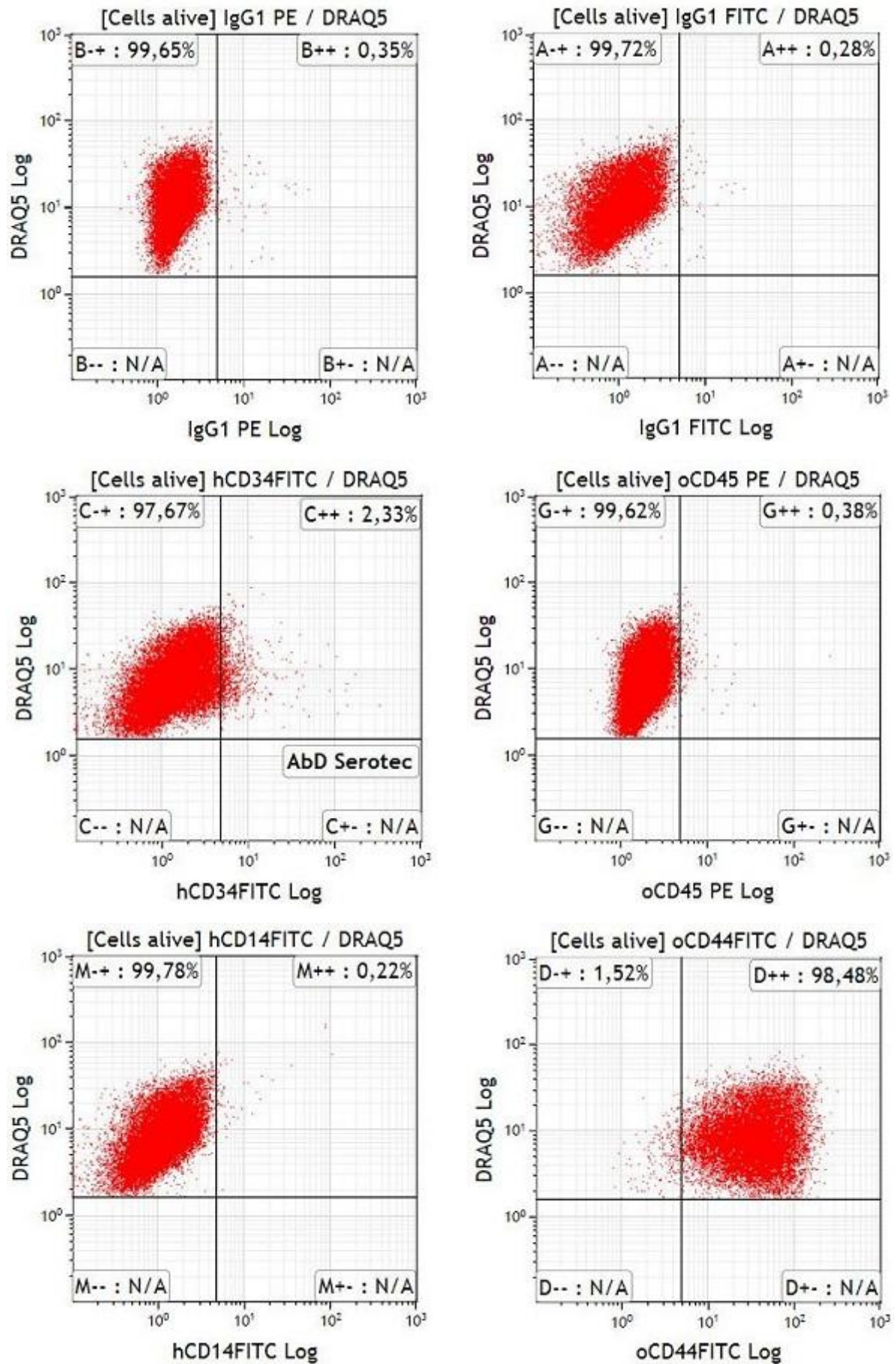


Abb.10 Dot-Plot-Darstellung der auf den P1-Zellen (Schaf 8) gemessenen CD-Marker; Analysefenster: vitale Zellen; x-Achse: antikörpermarkierte Zellen; y-Achse: DRAQ5-markierte Zellen; die Achsenausrichtung zur Bestimmung des Anteils an spezifisch markierten Zellen erfolgt anhand der Negativkontrollen IgG1 FITC/PE (s. erste Reihe).



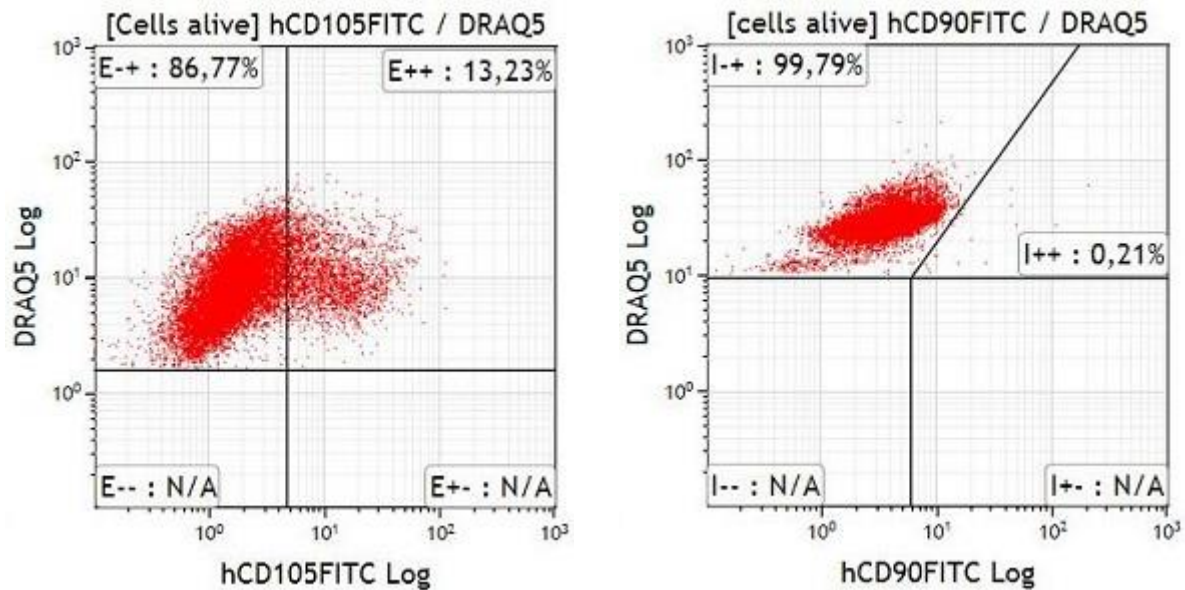
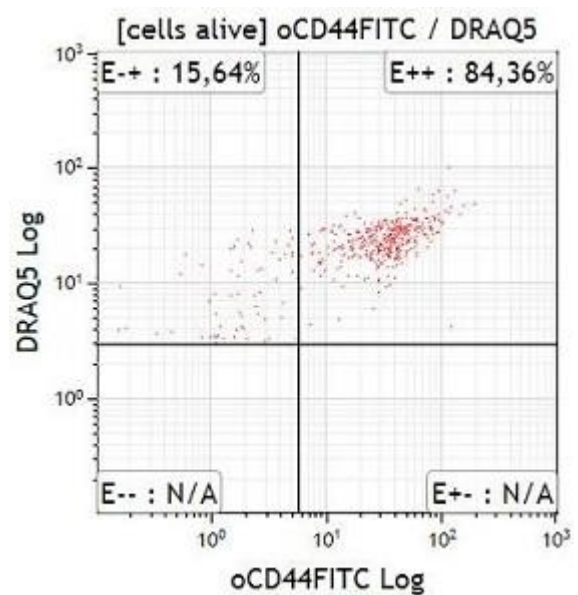
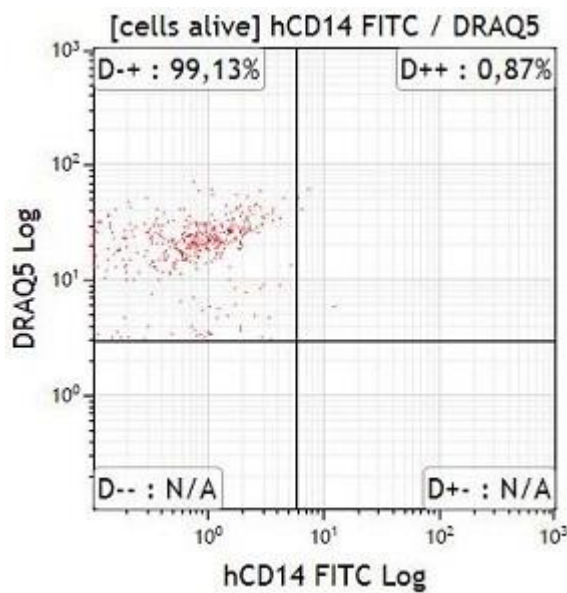
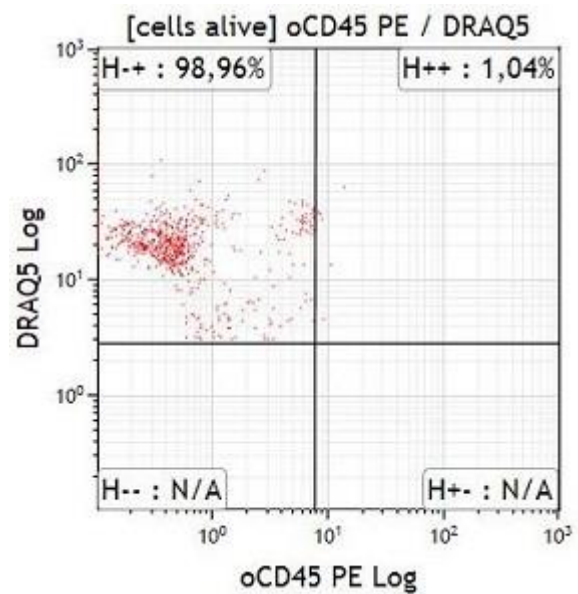
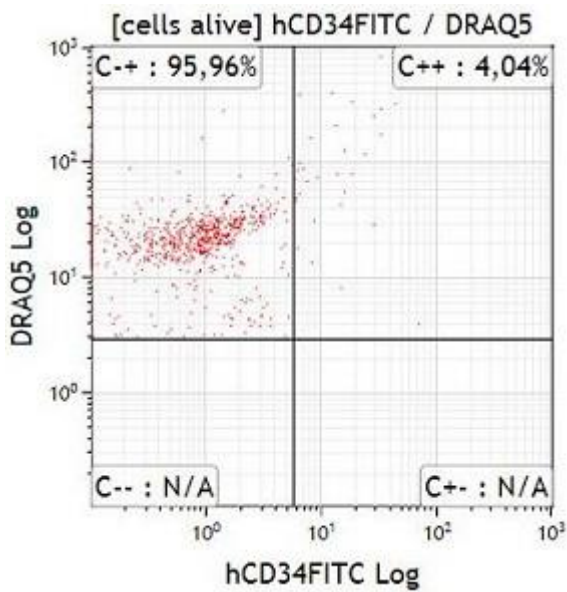
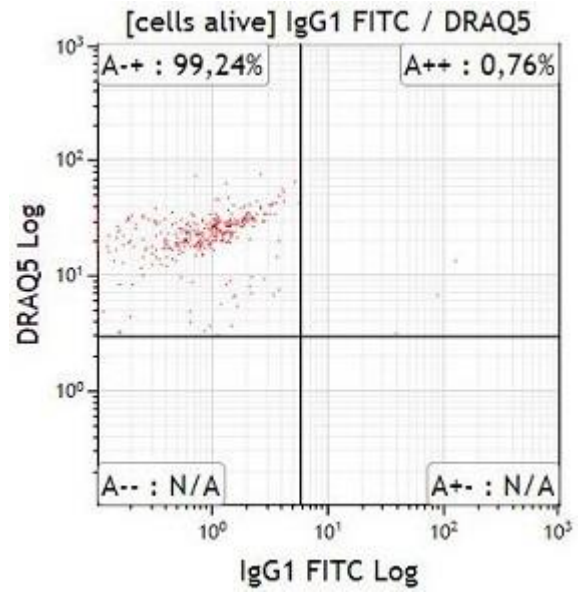
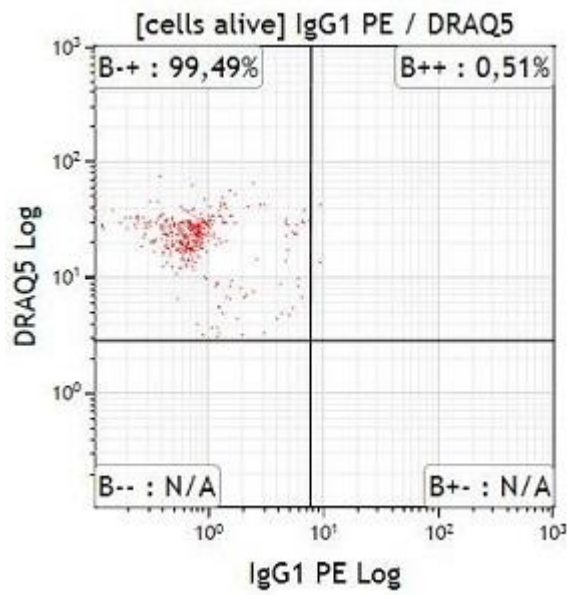


Abb.11 Dot-Plot-Darstellung der auf den P3-Zellen (Schaf 3) gemessenen CD-Marker. Die Messung des CD90-Markers erfolgte auf den P3-Zellen des Schaf 7; Analysefenster: vitale Zellen; x-Achse: antikörpermarkierte Zellen; y-Achse: DRAQ5-markierte Zellen; die Achsenausrichtung zur Bestimmung des Anteils an spezifisch markierten Zellen erfolgt anhand der Negativkontrollen IgG1 FITC/PE (s. erste Reihe).



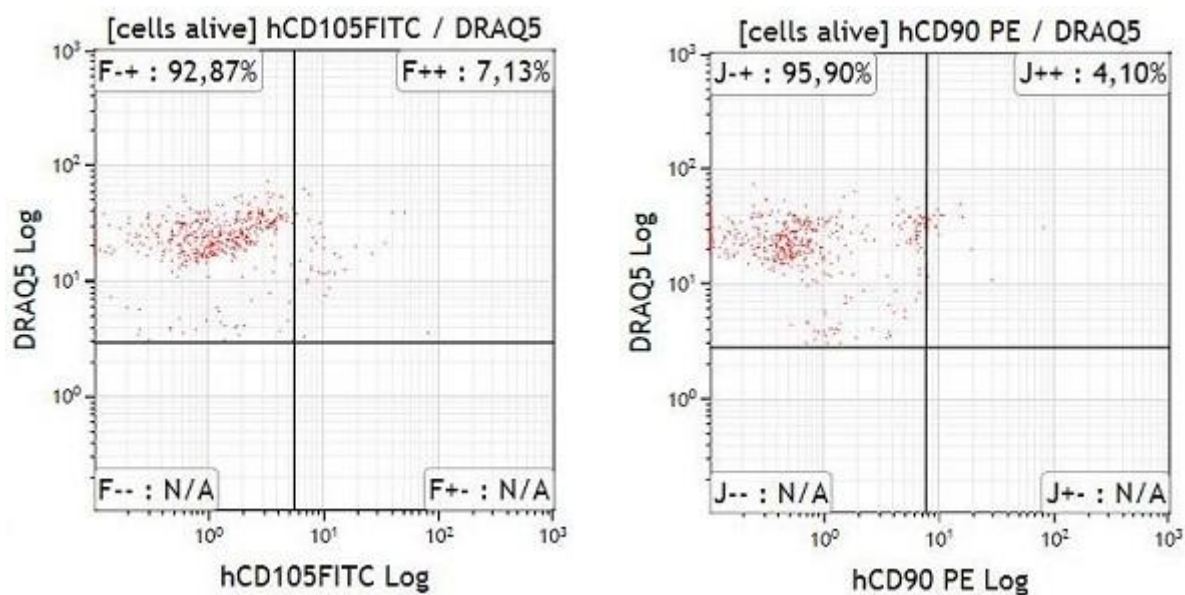


Abb.12 Dot-Plot-Darstellung der auf den P3-Zellen der Nabelschnurblutreihe (Schaf 11) gemessenen CD-Marker; Analysefenster: vitale Zellen; x-Achse: antikörpermarkierte Zellen; y-Achse: DRAQ5-markierte Zellen; die Achsenausrichtung zur Bestimmung des Anteils an spezifisch markierten Zellen erfolgt anhand der Negativkontrollen IgG1 FITC/PE (s. erste Reihe).

	Vollblut	P0	P1	P3	P3 (CB)
CD 34 [%]	4	1,9	0,8	2	2,3
CD 45 [%]	76,2	1,5	3,2	0,5	1
CD 14 [%]	1,8	0,4	0,2	0,1	0,5
CD 44 [%]	74	99,3	33,2	98	90,9
CD 90 [%]	--*	8,1*	0,1*	0,2*	2,4
CD 105 [%]	1,1	12,2	71	7,1	7,9

Tab.9 Arithmetisches Mittel der für den jeweiligen CD-Marker positiven Zellen in den einzelnen Passage (P); Angaben in Prozent der detektierten Gesamtzellzahl. CB=cord blood; n=1-3*; Messungen zu der Passage 2 wurden nicht durchgeführt. *Fehlende CD90-Messung in der Vollblut-Reihe wegen fehlender Verfügbarkeit des entsprechenden Antikörpers zum Testzeitpunkt. In der P0-Reihe konnte die CD90-Messung aus o.g. Grund in der P0-Reihe nur an Schaf 8, in der P1-Reihe an Schaf 8 und Schaf 14, in der P3-Reihe an Schaf 7 erfolgen. Alle anderen Marker wurden an mindestens zwei und max. vier Zellreihen der jeweiligen Passage gemessen.

3.2 Mikroskopische Analysen

Vor jedem Mediumwechsel wurden Zellen lichtmikroskopisch begutachtet und Ereignisse wie Zellablösung oder Infektion sowie morphologische und quantitative Veränderungen dokumentiert.

Vor Beginn der Inkubation waren in den noch nicht konfluenten Zellkulturen zwei morphologisch unterschiedliche Zelltypen erkennbar: spindelförmig fibroblastoide und abgeplattete Zellen (s. Abb. 13). Mit zunehmender Konfluenz nahm der Anteil der fibroblastoiden Zellen zu, bis die Kultur relativ homogen von dieser Zellpopulation dominiert wurde.

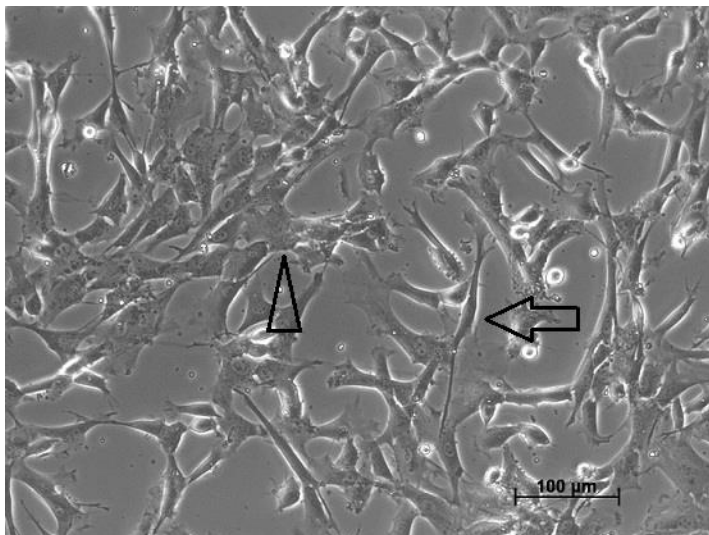


Abb.13 Tag 7 der Zellkultur. Zwei morphologisch unterschiedliche Zelltypen erkennbar:

1. spindelförmige Zellen (←)
2. abgeplattete Zellen mit Ausläufern (Δ). Zellreihe Schaf 1 P1, 200-fache Vergrößerung.

Während die Kontrollgruppe eine vorwiegend fibroblastoide Morphologie beibehielt, zeigten die stimulierten Zellen eine hiervon differierende Morphologie und eine initial höhere Proliferationsrate, die jedoch mit zunehmender Differenzierung abnahm.

Auch untereinander zeigten die Stimulationsgruppen sehr unterschiedliche Formen: Insbesondere fanden sich unter osteogener Stimulation die für die osteogene Differenzierung und Biomineralisierung charakteristischen *Bone nodules*: Aggregate aus kleinen runden bis kuboiden Zellen. Demgegenüber bildeten sich im chondrogenen Ansatz Zellcluster aus, die auch morphologisch Chondrozyten entsprachen. Im Gegensatz zu der Kontrollgruppe waren die adipogen stimulierten Zellen polygonal und wiesen bereits nach zehn Tagen intrazelluläre Fettvakuolen

auf, welche sich bis zum Tag 21 der Stimulation deutlich vergrößerten und teilweise konfluieren (s. exemplarische Abb. 14-17).

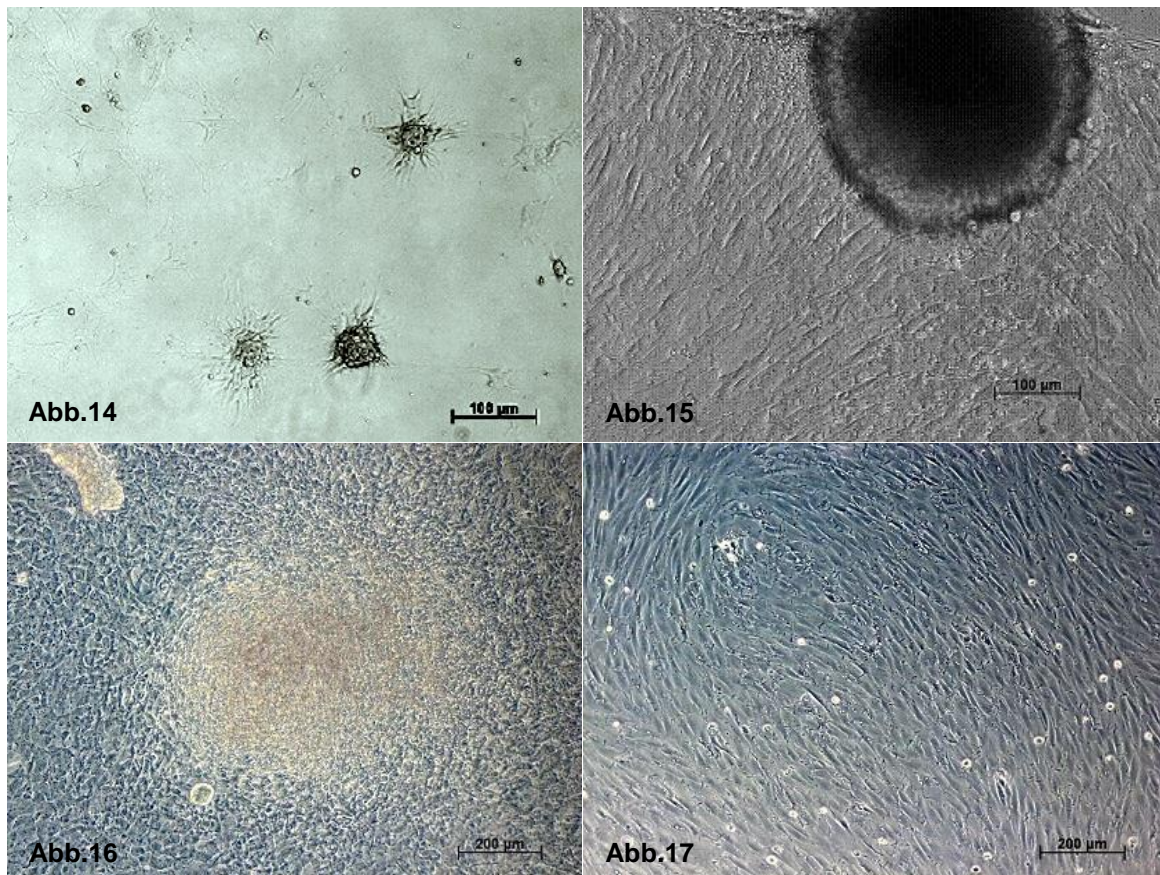


Abb.14 Zelluläre 3D-Konstrukte, Tag 7 der chondrogenen Stimulation (Schaf 1 P1).

Abb.15 Knochenknötchen (sog. bone nodules), Tag 9 der osteogenen Stimulation (Schaf 1 P1).

Abb.16 Lokale Anhäufung von Fettvakuolen, Tag 15 der adipogenen Stimulation (Schaf 1 P3).

Abb.17 Unstimulierte Kontrollgruppe, Tag 14 der Kultivierung (Schaf 1 P3).

3.3 Immunzytochemische Analysen

3.3.1 Peripheres Blut

Am Tag 10 und Tag 21 der Stimulation wurden die immunzytochemisch und zytochemisch gefärbten und fixierten Wellplatten lichtmikroskopisch ausgewertet und die Intensität der Färbungen semiquantitativ beurteilt, indem je nach Farbtintensität ein bis drei Punkte vergeben wurden (s. Abb. 18). Bei fehlender Anfärbbarkeit wurden null Punkte, bei intensiver Anfärbbarkeit wurden drei Punkte vergeben. Das arithmetische Mittel inkl. der Standardabweichung für die jeweiligen Ansätze ist in der Abbildung 19 aufgeführt.

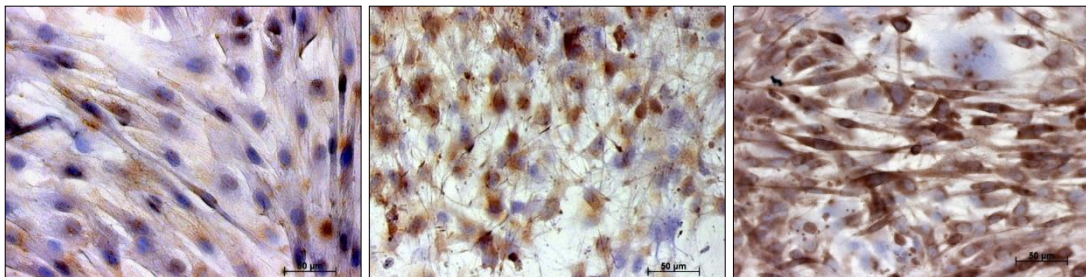
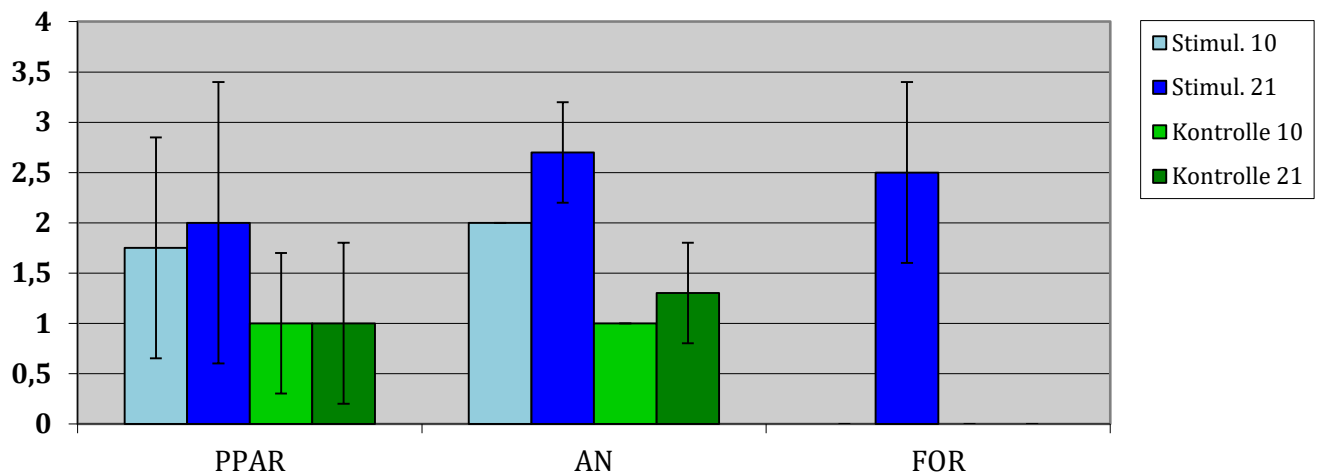
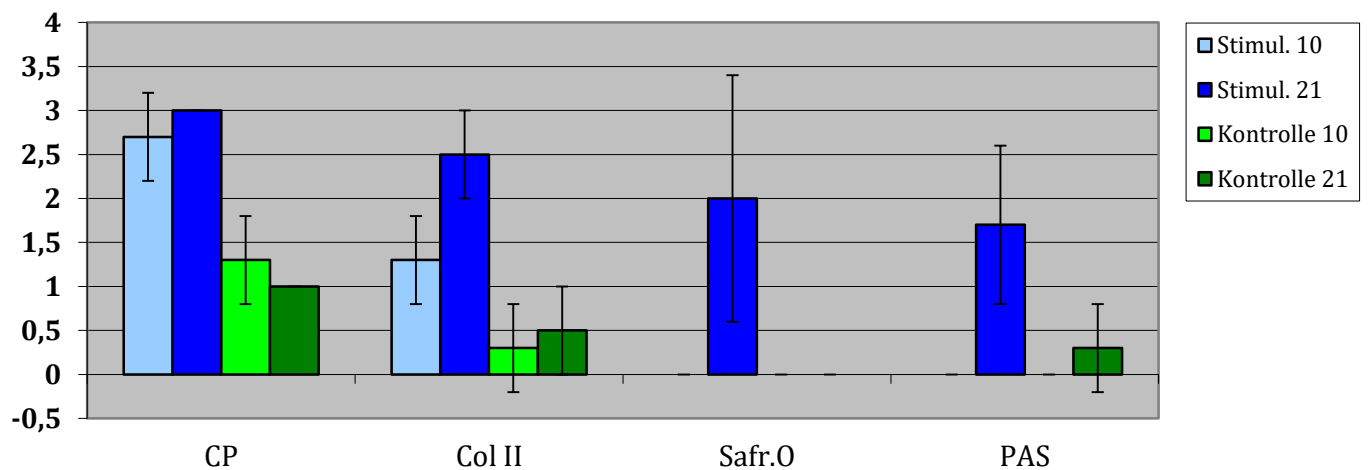


Abb.18 Exemplarische Einstufung der Anfärbbarkeit von links nach rechts: geringe Intensität (1 Punkt), mittlere Intensität (2 Punkte), hohe Intensität (3 Punkte).

Adipogene Stimulation und unstimulierte Kontrollen:



Chondrogene Stimulation und unstimulierte Kontrollen:



Osteogene Stimulation und unstimulierte Kontrollen:

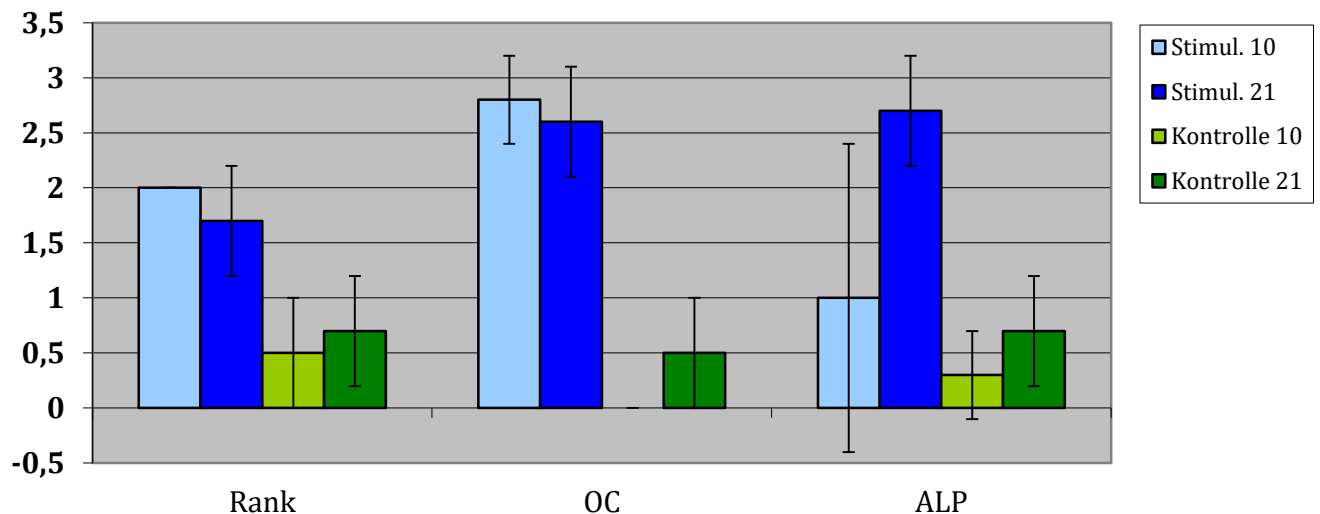


Abb.19 Arithmetisches Mittel inkl. Standardabweichung der Farbintensität für die jeweiligen Marker am Versuchstag 10 und 21, n:2-4; AN:Adiponectin, FOR:Ölrot O, CP:Cartilage Proteoglycan, Col II:Collagen II, Safr.O:Safranin O, OC:Osteocalcin, ALP:alkalische Phosphatase; Fehlende Balken entsprechen Wert 0;

Auswertung Kinetikpunkt 2 (Tag 10):

Adipogene Stimulation: Bereits am Stimulationstag 10 zeigten sich positive Färbungen sowohl für Adiponectin als auch für PPAR (s. Abb. 20). Es waren bereits Fettvakuolen in den stimulierten Zellen lichtmikroskopisch erfassbar. Sie waren jedoch noch zu klein für eine intensive Anfärbbarkeit mit Ölrot O.

Chondrogene Stimulation: Die stimulierten Zellen zeigten eine starke Anfärbung von Cartilage Proteoglycan und eine moderate Anfärbung von Collagen II (s. Abb. 20). Die histologischen Färbungen zum Nachweis von Chondroitinsulfat mittels Safranin O und Glykosaminoglykanen mittels Alcianblau-PAS fielen zu diesem Zeitpunkt negativ aus. Lichtmikroskopisch waren kaum Zellcluster in der chondrogen stimulierten Kultur vorhanden.

Osteogene Stimulation: Vor allem in den Bereichen der *bone nodules* zeigte sich eine intensive Anfärbbarkeit von Osteocalcin (s. Abb. 20). Die alkalische Phosphatase zeigte eine weitestgehend diffuse Verteilung in der osteogen stimulierten Zellkultur (s. Abb. 25).

Unstimulierte Kontrollgruppe: Die Kontrollpopulationen wiesen deutlich geringere Anfärbbarkeit von Adiponectin, PPAR, Rank, Cartilage Proteoglycan und v.a. für Collagen II (s. Abb. 20). Die Färbung für Osteocalcin fiel in der Kontrollgruppe negativ aus. Des Weiteren ließen sich keine Fettvakuolen, Chondroitinsulfat oder Glykosaminoglykane und nur geringe Mengen an alkalischer Phosphatase nachweisen (s. Abb. 26).

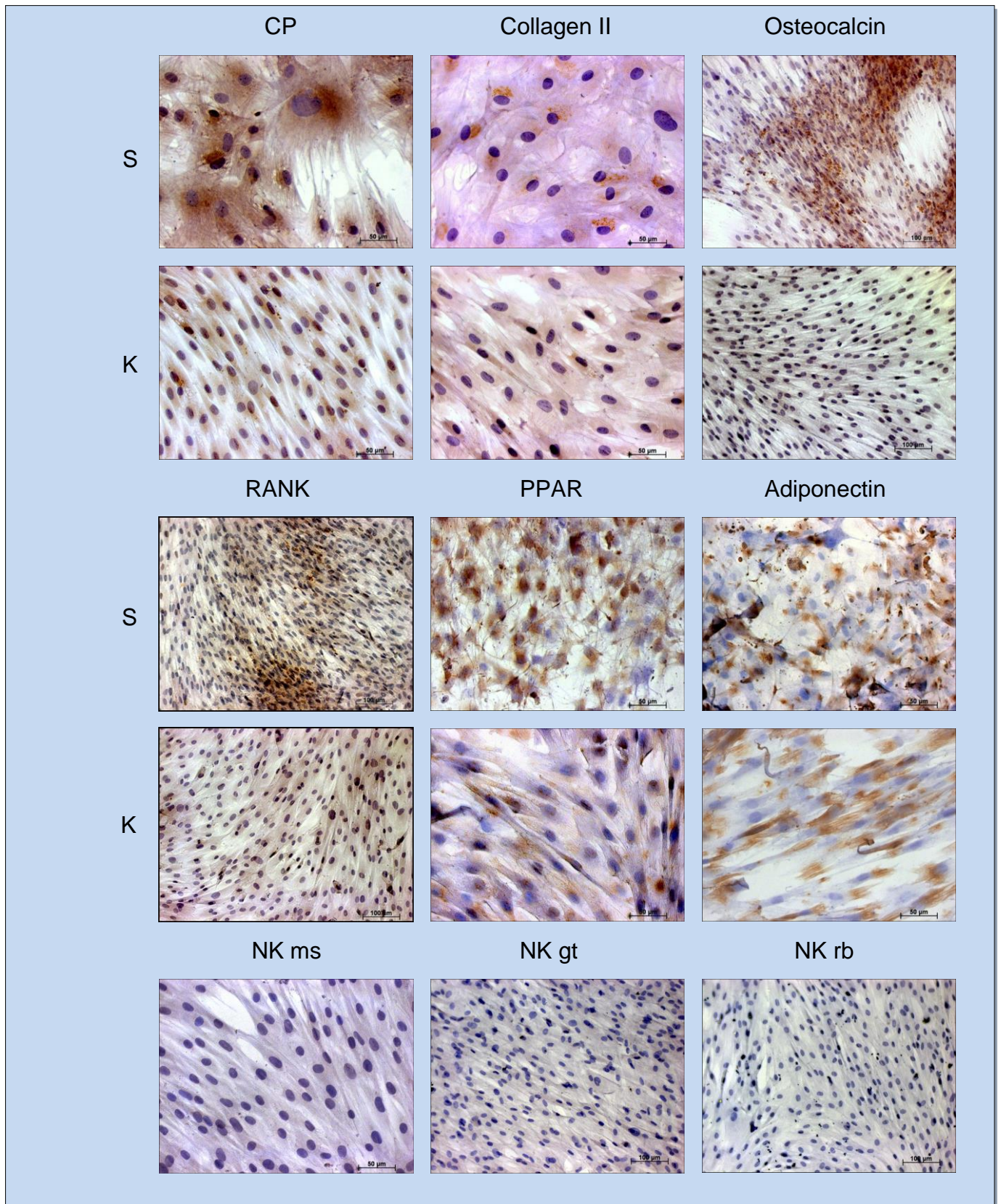


Abb.20 Repräsentative Fotos der Anfärbbarkeit mit den oben genannten Antikörpern am Inkubationstag 10. Erste und dritte Reihe (S): Chondrogen, osteogen und adipogen stimulierte Zellen; Zweite und vierte Reihe (K): unstimulierten Kontrollen unter den gleichen Färbebedingungen. Fünfte Reihe: Negativkontrollen (ms:Maus; gt:Ziege; rb:Kaninchen); Zellreihen: Schaf 1, Schaf 7, Schaf 8 und Schaf 14; 200-fache bzw. 400-fache Vergrößerung.

Auswertung Kinetikpunkt 3 (Tag 21):

Adipogene Stimulation: Die Intensität der immunzytochemischen Fettmarker PPAR und v.a. Adiponectin nahm zum Tag 21 der Stimulation zu (s. Abb. 21). Eine deutliche quantitative Steigerung war bei den Ölrot O-positiven intrazellulären Vakuolen zu sehen, welche erstmals intensiv angefärbt werden konnten (s. Abb. 24).

Chondrogene Stimulation: An diesem Kinetikpunkt zeigte sich eine deutliche Zunahme der Anfärbbarkeit von Collagen II und eine geringe Zunahme der Anfärbbarkeit von Cartilage Proteoglycan (s. Abb. 21). Es gelang die erstmalige Darstellung der sauren Mucosubstanzen mittels Alcianblau-PAS, als Hinweis auf eine fortschreitende Differenzierung der Zellen zu Chondroblasten (s. Abb. 23). Nun ließ sich auch das Chondroitinsulfat mit Safranin O darstellen, besonders deutlich im Bereich der für die chondrogene Zellreihe typischen 3D-Konstrukte (s. Abb. 22).

Osteogene Stimulation: Die Anfärbbarkeit von Osteocalcin blieb zwischen den beiden Kinetikpunkten annähernd konstant (s. Abb. 21). Die Anfärbbarkeit von Rank ging leicht zurück (s. Abb. 21). Nach 21 Tagen der osteogenen Stimulation zeigen sich Zellgruppen, welche eine vermehrte Produktion von alkalischer Phosphatase aufweisen (s. Abb. 27).

Unstimulierte Kontrollgruppen: Die Kontrollpopulationen blieben weitestgehend negativ für Chondroitinsulfat und Ölrot O-positive Fettvakuolen (s. Abb. 22 und Abb. 24). Die sauren Mucopolysacchare waren in der Kontrollgruppe ebenfalls kaum nachweisbar (s. Abb. 23). Es blieb bei der geringen Anfärbbarkeit für Adiponectin, PPAR, Rank, Collagen II und Cartilage Proteoglycan (s. Abb. 21). Eine geringe Zunahme ließ sich in der Anfärbbarkeit von alkalischer Phosphatase (s. Abb. 28) und Osteocalcin dokumentieren.

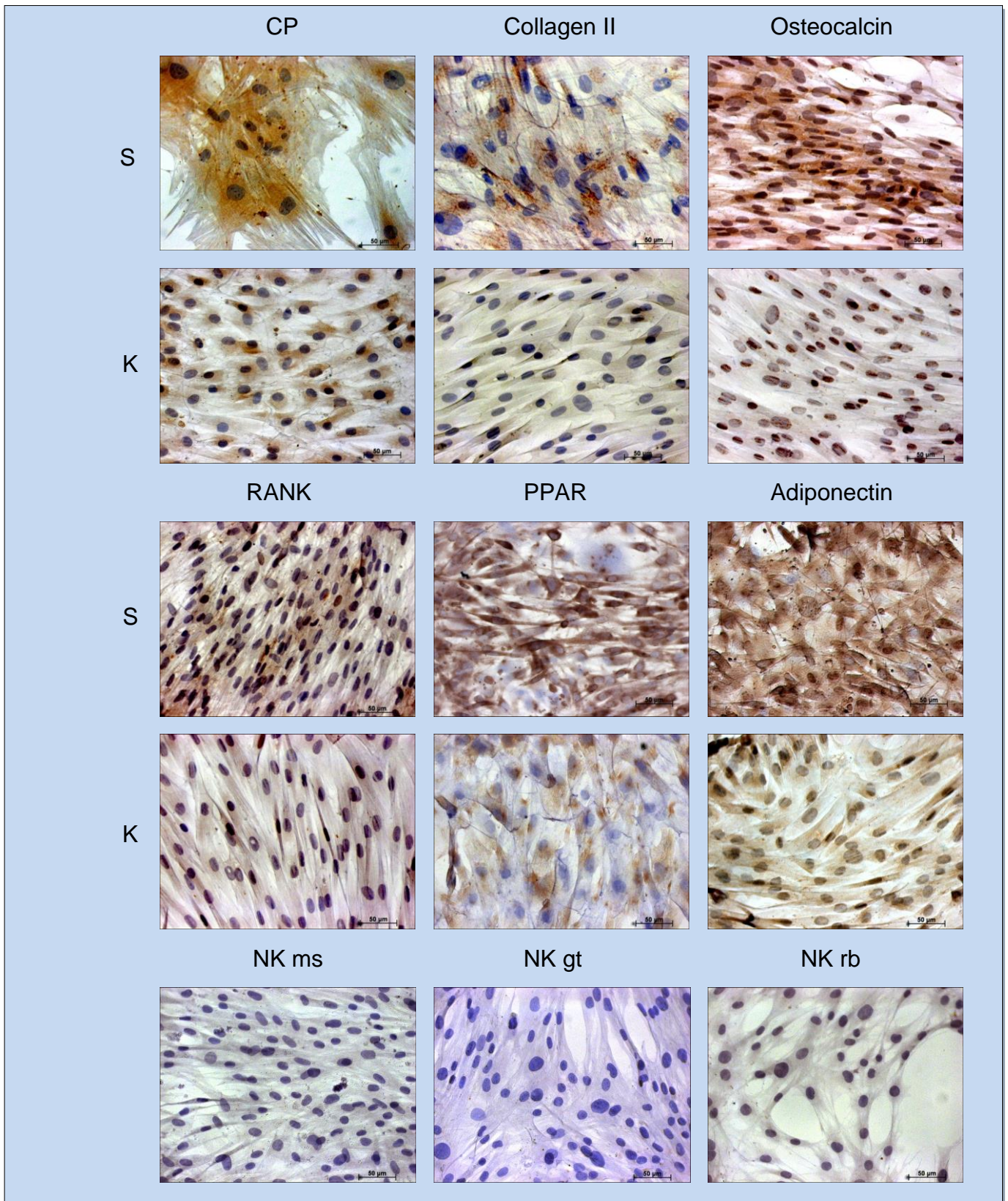


Abb.21 Repräsentative Fotos der Anfärbbarkeit mit den oben genannten Antikörpern am Inkubationstag 21. Erste und dritte Reihe (S): Chondrogen, osteogen und adipogen stimulierte Zellen; zweite und vierte Reihe (K): Unstimulierte Kontrollen unter den gleichen Färbebedingungen. Fünfte Reihe: Negativkontrollen (ms:Maus; gt:Ziege; rb:Kaninchen); Zellreihen Schaf 1, Schaf 7, Schaf 8 und Schaf 14; 400-fache Vergrößerung.

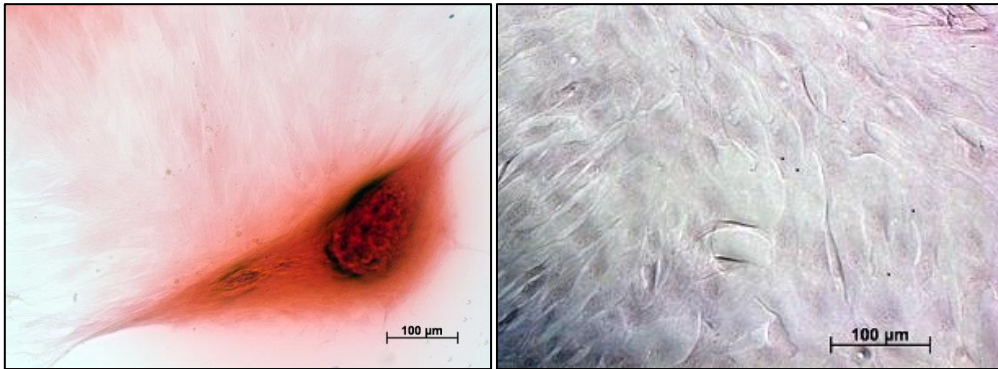


Abb.22 Safranin O-positiver 3D-Zellkonstrukt in der chondrogen stimulierten Zelllinie (links), unstimulierte Kontrolle (rechts); Schaf 8, Tag 21 der Stimulation; 200-fache Vergrößerung.

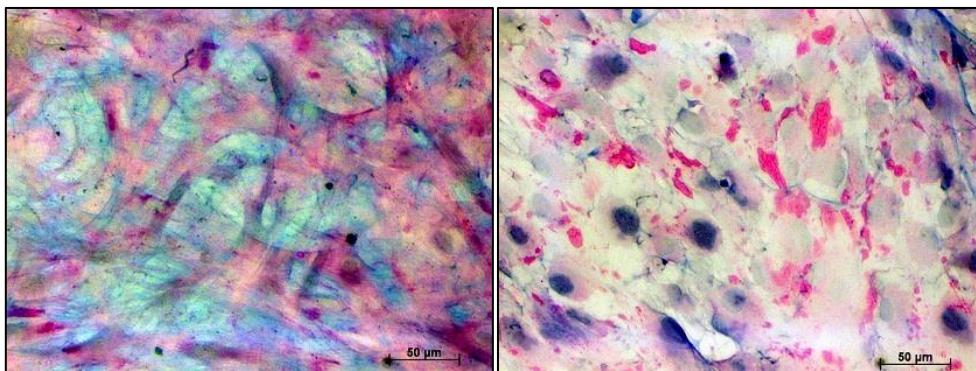


Abb.23 Alcianblau-PAS gefärbte chondrogen stimulierte Zelllinie (links), unstimulierte Kontrolle (rechts); Schaf 14, Tag 21 der Stimulation; 400-fache Vergrößerung.

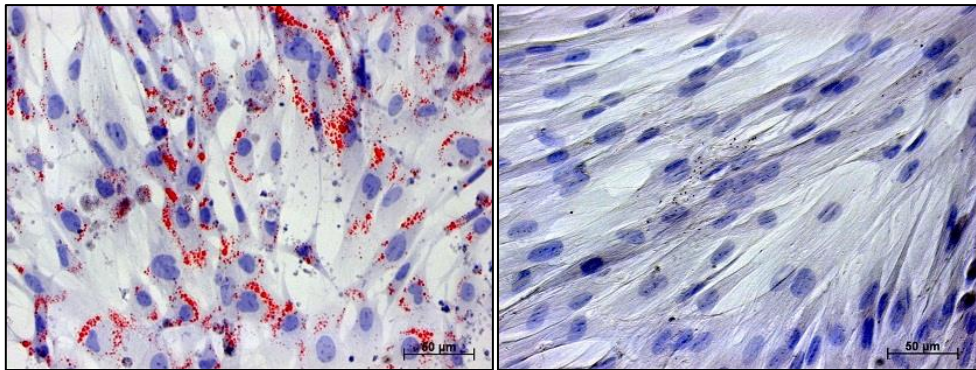


Abb.24 Ölrot O-positive intrazelluläre Vakuolen in der adipogen stimulierten Kultur (links), unstim. Kontrolle (rechts); Schaf 8, Tag 21 der Stimulation; Kernfärbung mit Mayers Hämalaun (blau), 400-fache Vergrößerung.

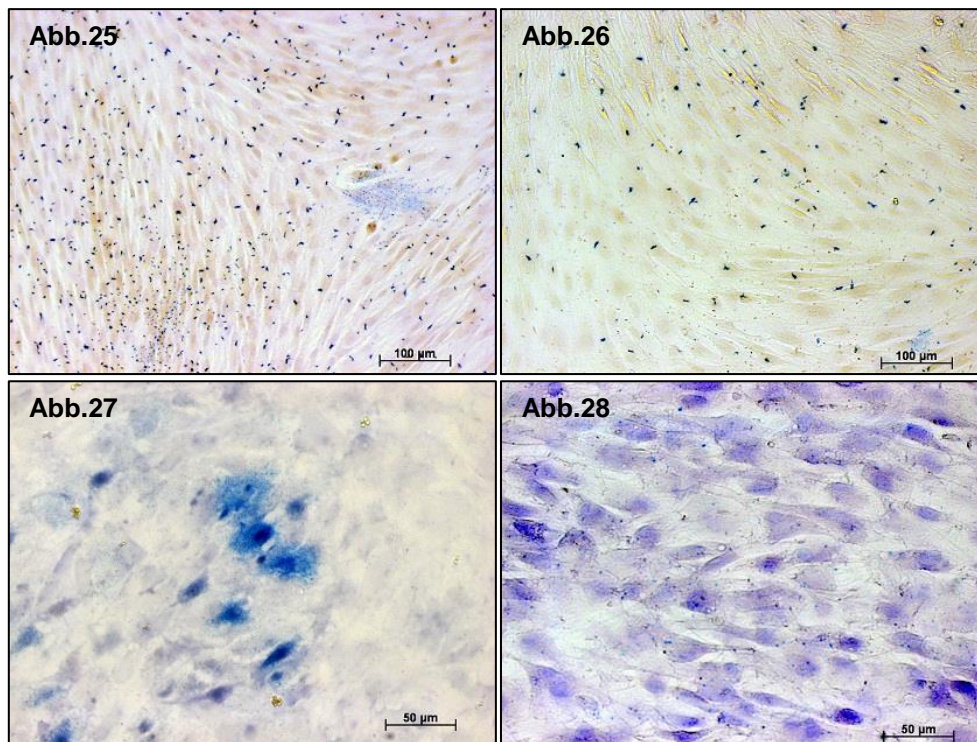


Abb.25 Teils gruppierte Expression von ALP (türkisblau) in der osteogen stimulierten Zellkultur; Schaf 1, Tag 10 der Inkubation.

Abb.26 Diffuse Verteilung der ALP in der unstimulierten Kontrolle. Schaf 1, Tag 10 der Inkubation.

Abb.27 Starke, gruppierte Expression von ALP am Tag 21 der osteogenen Inkubation, Kernfärbung mit Mayers Hämalaun (blau-violette).

Abb.28 Weiterhin ungerichtete Verteilung der ALP-Expression in der unstimulierten Zellkultur. Tag 21 der Inkubation.

3.3.2 Peripheres versus Nabelschnurblut

Die Nabelschnurblutzellen, welche bei der Sectio von zwei weiteren Schafen (Schaf 10 und Schaf 11) gewonnen wurden, wurden unter den gleichen Kultivierungsbedingungen wie die peripheren Blutzellen ausgesät, 21 Tage lang osteogen, chondrogen und adipogen stimuliert und anschließend dem gleichen FärbeprozEDURE unterzogen. Da das primäre Studienziel ein Vergleich zwischen dem peripheren Blut und Nabelschnurblut war, wurden bei diesem Ansatz keine zusätzlichen unstimulierten Kontrollen durchgeführt.

Adipogene Stimulation: Nach 10 Tagen adipogener Stimulation zeigte sich eine mit den PB-Zellen vergleichbare Anfärbbarkeit von Adiponectin und eine etwas geringere Anfärbbarkeit von PPAR. In der CB-Population waren allerdings bereits nach 10 Tagen Ölrot O-positive Fettvakuolen nachweisbar (s. Abb. 39). Am

Kinetikpunkt 3 (Tag 21) ließ sich in der CB-Population eine Intensitätszunahme sämtlicher adipogener Marker dokumentieren (s. Abb. 37-38 und Abb. 40).

Osteogene Stimulation: Es zeigte sich eine geringere Anfärbarkeit von Osteocalcin am Tag 10 und Tag 21 in der osteogen stimulierten CB-Population im Vergleich zum peripheren Blut (s. Abb. 29). Die mäßige Expression von Rank war über beide Kinetikpunkte vergleichbar mit der PB-Zellkultur. Bereits am Kinetikpunkt 2 (Tag 10) lag eine mäßige Farbintensität der alkalischen Phosphatase in der CB-Zellpopulation vor. Ähnlich dem peripheren Blut nahm die Intensität am Tag 21 zu (s. Abb. 30 und Abb. 32).

Chondrogene Stimulation: Im Gegensatz zu der PB-Zellpopulation konnten in der chondrogen stimulierten CB-Kultur bereits am Kinetikpunkt 2 Glykosaminoglykane mittels Alcianblau-PAS nachgewiesen werden (s. Abb. 35). Die Anfärbarkeit von Cartilage Proteoglycan und Collagen II war über beide Kinetikpunkte vergleichbar stark mit der PB-Zellpopulation und nahm zwischen Kinetikpunkt 2 und 3 an Intensität zu (s. Abb. 33-34).

Die Ergebnisse der immunzytochemischen und histologischen Färbungen in der CB-Zellkultur sind in Tab. 10 zusammengefasst.

	CB Tag 10	PB Tag 10	CB Tag 21	PB Tag 21
Adiponectin	++	++	+++	+++
PPARγ	+	++	++	++
FOR	+	(+)	++	+++
Osteocalcin	+	+++	+	+++
Rank	++	++	++	++
ALP	++-+++	+	+++	+++
CP	++	+++	+++	+++
Collagen II	+	+	++	+++-+++
PAS	+	-	++	++

Tab.10 Anfärbarkeit der jeweiligen Marker am Tag 10 (Kinetikpunkt 2) und Tag 21 (Kinetikpunkt 3) der Stimulation in der CB-Zellpopulation (adipogene Stim.: Adiponectin, PPAR, Ölrot O; osteogenen Stim.: Osteocalcin, Rank, Alkalische Phosphatase; chondrogene Stim.: Cartilage Proteoglycan, Collagen II, Alcianblau-PAS); n:1-2; + : schwach, ++ : mäßig, +++ : stark, - : fehlende Anfärbarkeit.

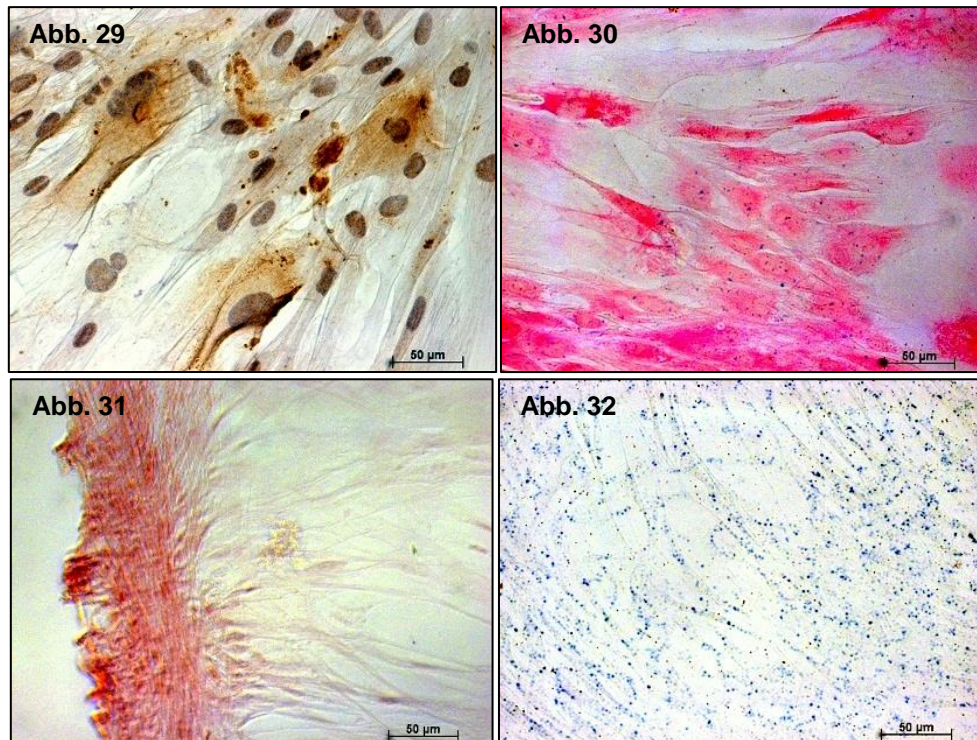


Abb.29 Darstellung von Osteocalcin am Tag 10 der Stimulation;
 Abb.30 Darstellung vom ALP blau (Kernfärbung mit Kernechtrot) am Tag 10 der Stimulation;
 Abb.31 Am Tag 21 der Stimulation ist die Mineralisierung mithilfe von Alizarin rot nachweisbar;
 Abb.32 Stärkere Ausprägung der ALP am Tag 21 (ohne Kernfärbung);
 Osteogen stimulierte CB-Zellkultur (Schaf 10 und 11); 400-fache Vergrößerung.

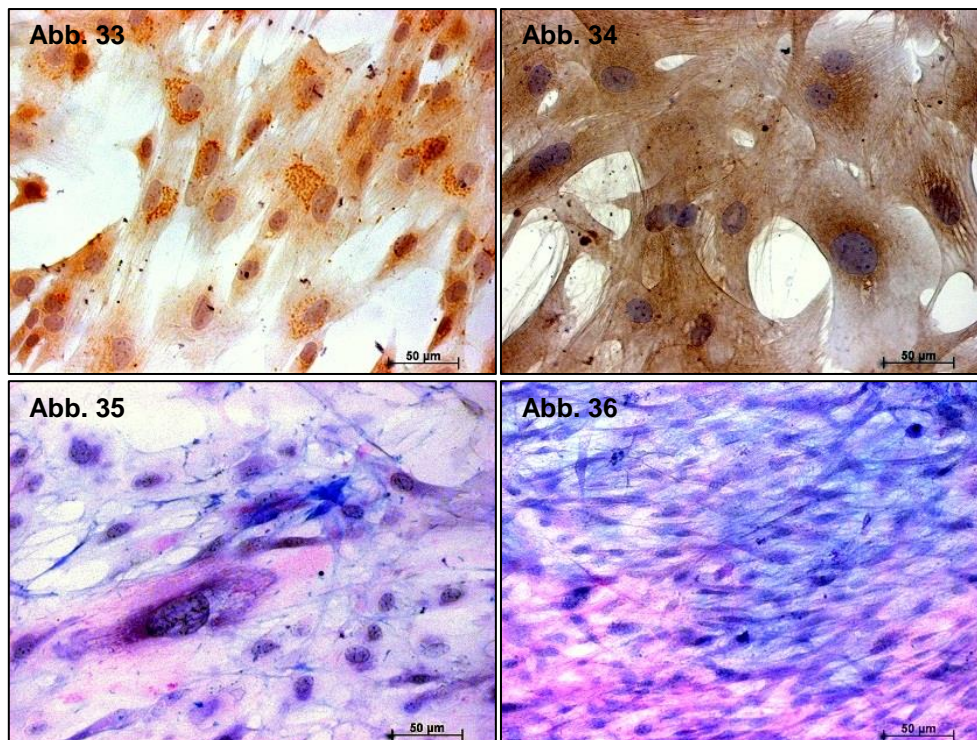


Abb.33 Bereits am Tag 10 der Stimulation deutliche Anfärbbarkeit von Collagen II;
 Abb.34 Anfärbbarkeit von CP am Tag 10 der Stimulation;
 Abb.35 Am Tag 10 weisen nur einzelne Bereiche saure Mucopolysaccharide auf;
 Abb.36 Am Tag 21 deutliche Zunahmen der Mucopolysaccharide erkennbar;
 Chondrogen stimulierte CB-Zellkultur (Schaf 10 und 11); 400-fache Vergrößerung.

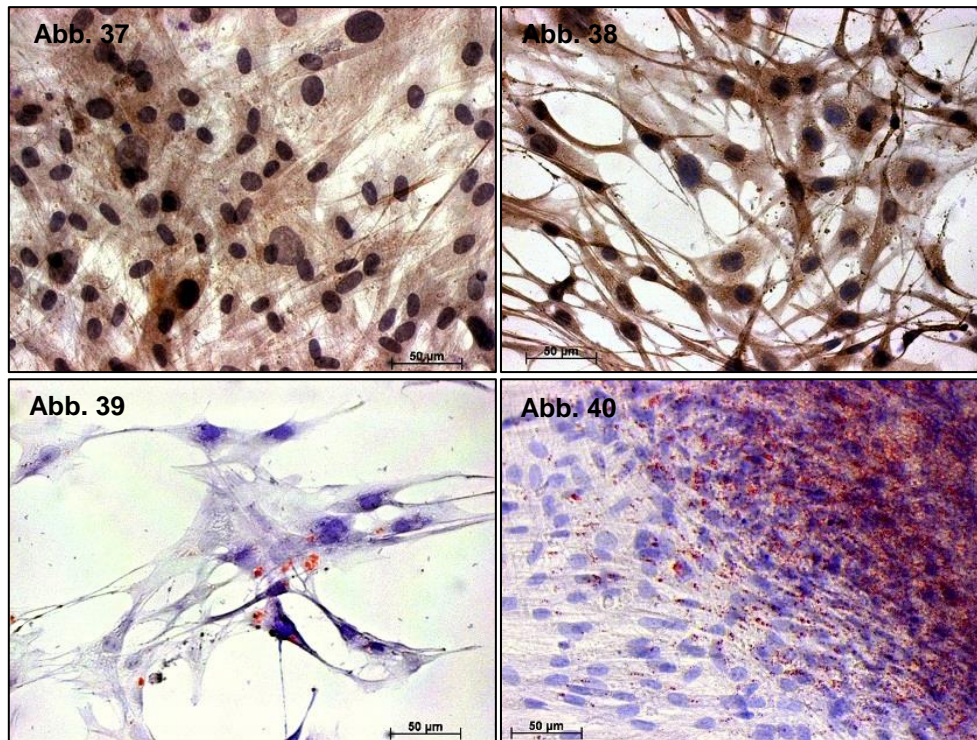


Abb.37 Deutliche Anfärbbarkeit von PPAR γ am Tag 21 der Stimulation;
 Abb.38 Deutliche Anfärbbarkeit von Adiponectin am Tag 21 der Stimulation;
 Abb.39 Am Tag 10 nur einzelne Zellen mit Ölrot O-positiven Fettvakuolen;
 Abb.40 Am Tag 21 beinhaltet bereits ein Großteil der Zellen konfluierende Fettvakuolen;
 400-fache Vergrößerung. Adipegen stimulierte CB-Zellreihen: Schaf 10 und Schaf 11.

3.4 Genanalysen

Zusätzlich wurden am Tag 10 und Tag 21 der Stimulation Genanalysen mittels RT-PCR durchgeführt. Diese ergänzende Methode hat besonders sensitiv und spezifisch den Differenzierungsnachweis, mitsamt zeitlichem Verlauf, sowie den Vergleich zwischen PB-MSC und USSC ergänzt.

Als positiver Kontrollmarker für die gesamte RT-PCR wurde das Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein sog. *Housekeeping*-Gen, mitgemessen. Die Auswertung erfolgte qualitativ.

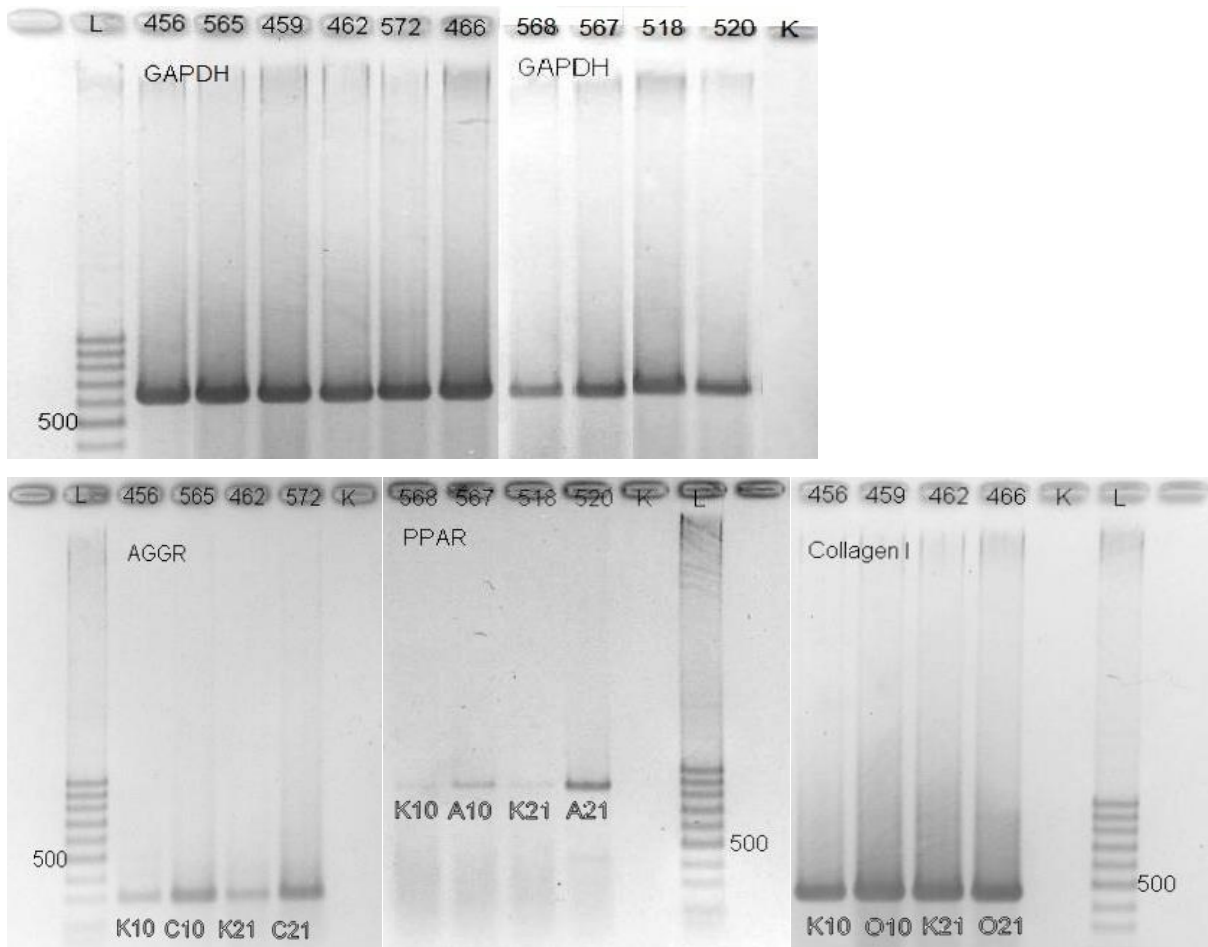


Abb.41 Fotoausschnitte von Agarosegelplatten nach erfolgter RT-PCR und Elektrophorese. L:DNA-Leiter in Basenpaaren (quantitativer Standard), K:Kontrolle aus aqua bidestillata; PPAR:Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor, AGGR:Aggrecan; K10/21:unstimulierte Zellen am Inkubationstag 10/21, C10/21:chondrogen stimulierte Zellen, A10/21:adipogen stimulierte Zellen, O10/21:osteogen stimulierte Zellen.

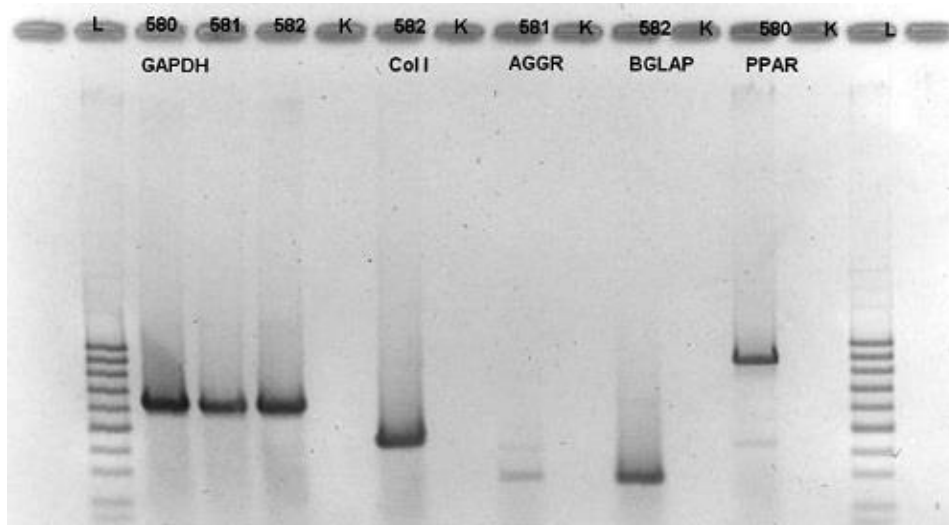


Abb.42 Agaroseplatte nach erfolgter PCR und Elektrophorese; Tag 21 der Stimulation (Probe 582 osteogen stim.; Probe 581 chondrogen stim.; Probe 580 adipogen stim.); Cord blood-Zellreihe (Schaf 11); L:DNA-Leiter in Basenpaaren (quantitativer Standard), K:Kontrolle aus aqua bidestillata; Col I:Collagen I, BGLAP:bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein:Osteocalcin.

3.4.1 Auswertung der RT-PCR

Da die RNA-Proben aus den einzelnen Stimulationsreihen nicht alle exakt die gleiche Quantität aufwiesen, wurde auf eine quantitative Analyse verzichtet und nach Auswertung der einzelnen PCR-Ergebnisse eine Unterteilung der Expressionsmuster in drei Gruppen vorgenommen: „keine Expression“, „mäßige Expression“, „starke Expression“.

Bis auf den osteogenen Marker Collagen 1, der bereits am Kinetikpunkt 2 stark ausgeprägt war, ließ sich die Expression von Aggrecan (chondrogener Marker) und PPAR γ (adipogener Marker) durch fortgeführte Stimulation bis zum Tag 21 steigern (s. Abb 41).

Die unstimulierte Kontrollgruppe zeigte ein vergleichbar starkes Collagen 1-Muster über beide Kinetikpunkte. Der chondrogene und der adipogene Marker zeigten nur eine schwache bis keine Expression in den unstimulierten Kontrollkulturen (s. Abb. 41).

Die USSC-Kultur zeigte ein vergleichbares Muster nach 21 Tagen der Stimulation, bei insgesamt schwächerer Expression von Aggrecan (s. Abb.42).

Eine Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse zeigt die Tab.11.

	PB Tag 10	PB Tag 21	Cord Blood Tag 21
Aggrecan	mäßig	stark	schwach
PPARγ	schwach	stark	stark
Collagen I	stark	stark	stark

Tab.11 Expressionsintensität von Aggrecan, PPAR γ und Collagen 1 in der jeweiligen Stimulationsgruppe am Inkubationstag 10 und Tag 21 in der RT-PCR; die hellblauen Spalten beinhalten die Ergebnisse für das periphere Blut (PB, n=4), die dunkelblaue Spalte zeigt die Ergebnisse der Nabelschnurblutzellen am Inkubationstag 21 (n=1).

4 Diskussion

4.1 Tiermodell im Tissue Engineering

Zurzeit ist der Einsatz von Tiermodellen im Forschungsbereich *Tissue Engineering* unverzichtbar. Neben den *in vitro*-Systemen stellen sie die Grundlage für die Testung neuer Materialien auf ihre Eignung als Knochenersatzstoffe (s. Kap. 1.3) in der gesamten Komplexität des Organismus dar.

Die *ex vivo*-Systeme vermögen Informationen zur akuten Zytotoxizität und ebenso Aussagen zur Zellproliferation sowie –differenzierung zu geben. Aufgrund der relativ kurzen Kultivierungszeitspanne und der Abwesenheit von systemischen Faktoren ist die Aussage von *in vitro*-Versuchen limitiert und macht weitergehende Untersuchungen in Form von *in vivo*-Tests erforderlich (Pearce et al., 2007).

Bislang sind Tiermodelle weniger standardisiert als die *in vitro*-Systeme und die Selektion eines geeigneten Tiermodells bleibt eine Herausforderung, insbesondere auf dem Gebiet des Stütz- und Bewegungsorgans.

Im Vorhinein sollte klar sein, dass jedes Tiermodell nur eine Annäherung an die humane Physiologie, Anatomie und Biochemie darstellt und nie ein exaktes Abbild ist. Diese Tatsache macht es so wichtig sich die einzelnen Unterschiede zwischen Mensch und der jeweiligen Spezies zu veranschaulichen, um das am besten geeignete Tiermodell zu definieren. Dabei sollen die Vor- und Nachteile der einzelnen Tiermodelle speziell auf die Erfordernisse der jeweiligen Fragestellung und des Studiendesigns abgestimmt werden, da es eine Verallgemeinerung in diesem Bereich nicht geben kann (Martini et al., 2001).

Die wichtigsten allgemeinen Selektionsfaktoren sind im Folgenden aufgeführt (Pearce et al., 2007):

- Beschaffungs- und Haltungskosten
- Verfügbarkeit
- Uniformität innerhalb der Rasse
- Anforderungen an die Tierhaltung
- Kenntnis der Anatomie, Biologie, Genetik und Physiologie
- Handhabung

- Lebensdauer
- Ethische Vertretbarkeit

In der Knochenregenerationsforschung kommen noch weitere Aspekte wie Speziesgröße, makroskopische und mikroskopische Knochenstruktur, Knochenzusammensetzung und -Umbauvorgänge (*Remodelling*) hinzu.

Kleintiere wie Maus, Ratte und Kaninchen weisen viele Vorteile im Bereich der allgemeinen Selektionsfaktoren auf, wodurch sich ihr häufiger Einsatz in der orthopädischen Forschung erklärt. Eigene Erfahrungen haben gezeigt, dass die Verfügbarkeit der Antikörper für diese Spezies im Vergleich zu anderen Spezies größer ist. Die Nachteile eines Kleintiermodells liegen in seiner geringen Größe, welche den Einsatz von Prothesen und Implantaten limitiert, zumal spezielle chirurgische Instrumente und Techniken für die Implantationen notwendig sind. Der Knochenstoffwechsel ist wesentlich höher als beim Menschen, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert (Pearce et al., 2007). Im Vergleich von sieben verschiedenen Spezies zeigt die Ratte die geringsten Übereinstimmungen ihres Skelettsystems mit dem des Menschen (Aerssens et al., 1998). Diese Nachteile haben zusammen mit immer größeren gesetzlichen Hürden und Vorgaben dazu geführt, dass die Verwendung von Kleintieren in der orthopädischen Forschung in den letzten Jahren abgenommen hat (Martini et al., 2001).

Gleiches gilt für den Einsatz von Primaten: Diese stellen zwar aufgrund ihrer Analogie zum Menschen ein exzellentes Modell dar, der Einsatz ist aber aus ethischer Sicht höchst bedenklich und soll vermieden werden, wenn alternative Spezies wie Hunde, Schafe oder Schweine verfügbar sind (Zander, 2009).

In den letzten Jahrzehnten hat der Einsatz von Schafen, Ziegen und Schweinen eine leichte Zunahme erfahren. Die Abbildung 43 veranschaulicht die Anteile der Großtiere in der orthopädischen Forschung von 1990 bis 2001.

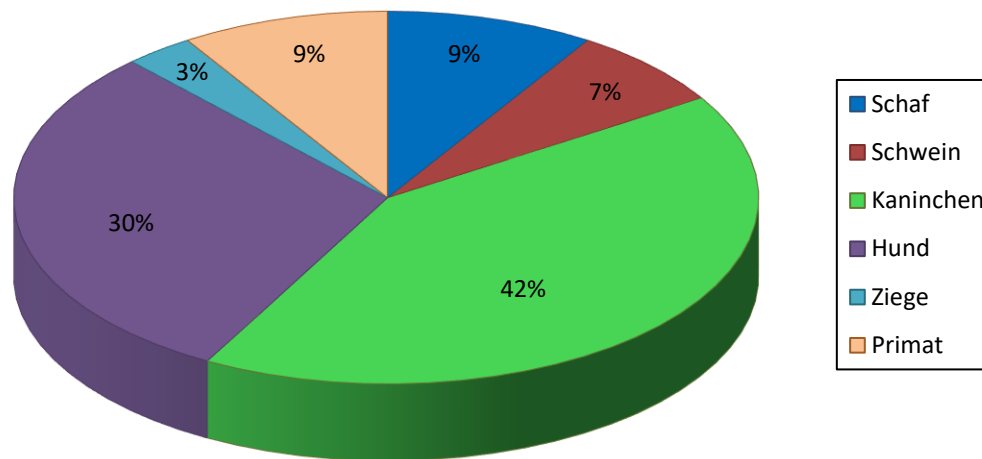


Abb.43 Prozentuale Nutzung einiger wichtiger Spezies in der orthopädischen Forschung in den Jahren 1990 bis 2001 (Mod. n. L.Martini et al. 2001)

Nach dem Kaninchen stellt der Hund das bis heute mit Abstand am häufigsten eingesetzte Großtiermodell dar. Es zeigt, mit Ausnahme der Primaten, die genaueste Übereinstimmung mit dem humanen Skelettsystem, v.a. was die Knochenzusammensetzung betrifft (Pearce et al., 2007). Durch seine gute Dressurbereitschaft kann der Hund aktiv in den Versuchsprozess einbezogen werden. Inzwischen nimmt man jedoch immer mehr Abstand von diesem Modell, da die Verwendung von Hunden als Versuchstier ethisch umstritten ist. Der Hund gilt als Haustier und es wird rasch eine beidseitige emotionale Verbundenheit aufgebaut. Die Haltung von Hunden ist kosten- und personalaufwendig, da sie nicht wie Schafe u.a. in Gruppen im Laufstall gehalten werden können (Zander, 2009). Aus diesen Gründen sollte nach Möglichkeit auf ein anderes Versuchstier ausgewichen werden.

Das Schwein hat bei der Knochenzusammensetzung und beim Knochenremodelling viele Übereinstimmungen mit dem Menschen, allerdings wächst es sehr schnell und erreicht ein enormes Endgewicht, was für Langzeitstudien von großem Nachteil ist. Außerdem zeigen Schweine häufig aggressives und lautes Verhalten, was den Umgang mit ihnen erschwert (Pearce et al., 2007).

Das Schaf als dritter Vertreter des Großtiermodells liegt v.a. bei der Anatomie seiner langen Knochen und bei seinem Gesamtgewicht im Vorteil gegenüber dem Hund. Darüber hinaus hat Willie gezeigt, dass die Knochenregenerationsaktivität sowie die Mineralisierung des Knochens von

Schafen bei der Anwendung von Implantaten keine signifikanten Unterschiede zu denen des Menschen zeigen (Willie et al., 2004).

Bei der mikroskopischen Knochenstruktur dominiert beim Schaf im Gegensatz zum Menschen der Geflecht- und primärer Lamellenknochen aus Primärosteonen. Dabei gibt es Unterschiede in der Abfolge der Osteogenese: Kaudales Femurende sowie die Humerus- und Radiusdiaphyse zeigen den frühesten Umbau zum Sekundärknochen mit Havers'schen Osteonen (Newman, Turner and Wark, 1995; Martiniaková et al., 2007). Ähnliches gilt für die Knochendichte, wobei die Schafsspongiosa insgesamt als dichter und steifer beschrieben wird. Ihre Zusammensetzung weicht allerdings vergleichsweise geringfügig von der menschlichen ab (Nafei et al., 2000). Der ovine kortikale Knochen unterscheidet sich signifikant in seinem Gehalt an Trockensubstanz, Kollagen, IGF-1 und Proteinen von humanem Knochen, was Einfluss auf seine Qualität zu haben scheint, z.B. auf die Frakturresistenz. Es besteht ebenfalls eine Korrelation zwischen Knochendichte und Frakturresistenz, diese lässt sich allerdings nicht auf die verschiedenen Spezies übertragen (Aerssens et al., 1998).

Tabelle 12 fasst die Übereinstimmungen mit dem menschlichen Skelett zusammen:

makroskop. KS	mikroskop. KS	Knochenzusammensetzung	Remodelling
+++	+	++	+++

Tab.12 Übereinstimmung zwischen ovinem und humanem Skelett; + wenig Übereinstimmung, ++ mäßige Übereinstimmung, +++ gute Übereinstimmung; KS : Knochenstruktur; mod. n. Al Pearce 2007 (Pearce et al., 2007)

Will man versuchen die Differenzen in der Knochenzusammensetzung zu umgehen, kann man auf junge Schafe mit einem unausgereiften Skelettsystem zurückgreifen. Dieses enthält anteilig mehr Kollagen und weniger Mineralien, ist weniger dicht und elastischer als das ausgereifte ovine Skelett (Nafei et al., 2000). Dadurch sind seine mechanischen Eigenschaften denen des Menschen noch ähnlicher. Neun bis zehn Jahre alte Mutterschafe sind wiederum ein etabliertes Modell für die Osteoporose-/Osteopenieforschung (Newman et al., 1995; Pearce et al., 2007).

4.1.1 Das Schaf als Tiermodell

Obgleich der Hund in einigen Eigenschaften seines Skelettsystems dem Menschen näher kommt als das Schaf, spricht in diesem speziellen Fall vieles für den Einsatz des ovinen Modells: Diese Spezies ist in ausreichender Anzahl und gleicher Rasse verfügbar, kann als Stalltier in Gruppen in einem Laufstall gehalten werden und stellt keine hohen Anforderungen an ihre Haltung. Im Gegensatz zum Hund gilt das Schaf als Nutztier und seine Verwendung für das Experiment ist aus ethischer und emotionaler Sicht besser vertretbar (Zander, 2009). Die mechanisch-biochemischen Eigenschaften des Schafsknochens sind bereits gut untersucht (Nafei et al., 2000; Martini et al., 2001; Pearce et al., 2007; Martiniaková et al., 2007), sodass auf einen ausreichenden Informationspool zurückgegriffen werden kann.

In jüngster Vergangenheit wurde das Schaf auch für die *in vitro*-Untersuchungen an Nabelschnurblutzellen entdeckt (Jäger et al., 2006). Gerade in der Knochenregenerationsforschung und im Bereich des *Tissue Engineering* sollten die *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen zur Qualitätssteigerung an derselben Tierspezies vollzogen werden und damit die speziesbedingten Differenzen vermieden werden.

In Anbetracht der obigen Ausführungen stellt das Schaf ein gutes Modell für die Knochenregenerationsforschung dar und die Ergebnisse lassen sich in ausreichendem Maße auf den Menschen übertragen.

4.2 Progenitorzellen im peripheren Blut

Als Gesamtergebnis der vorliegenden Arbeit ist festzuhalten, dass im peripheren Blut von gesunden jungen Schafen mesenchymale Progenitorzellen nachweisbar sind. Dieser Sachverhalt wurde nach meinem Wissensstand erstmalig am ovinen Modell gezeigt und stellt somit eine wichtige Erkenntnis auf dem Gebiet der MSC-Forschung dar (Orthopedic Reviews, 2010).

Progenitorzellen wurden hauptsächlich im peripheren Blut nachgewiesen, wenn pathologische Prozesse vorlagen oder zuvor eine Ausschüttung mittels G-CSF initiiert wurde (Augello et al., 2010). Jedoch beschrieben auch andere Autoren bereits das Vorhandensein von MSC im peripheren Blut von gesunden

Personen und Tieren (Zvaifler et al., 2000; Kuznetsov et al., 2001; Chong et al., 2011; Yazid et al., 2011).

4.2.1 Kultivierung und Nachweis

Der Anteil an unerwünschten Zellen wie Erythrozyten, Monozyten, Granulozyten und Thrombozyten wurde durch relativ lange Kultivierungszeiten minimiert, da aufgrund ihrer Adhärenz nach über sieben Tagen fast nur Progenitorzellen mit ihren besonderen Selbsterneuerungseigenschaften überleben. Offenkundig wird dieser Sachverhalt, wenn man sich den Anteil CD14-positiver Zellen (Monozyten und Makrophagen) anschaut: Mit steigender Passagezahl nimmt der Anteil dieser Zellen sukzessive ab, bis er kaum noch nachweisbar ist. Ähnliches trifft für CD45-positive Zellen (Lymphozyten, Granulozyten und Thrombozyten) zu (s. Tab. 9). Geht man also nach negativer Selektion vor, wird die Zellkultur von Passage zu Passage reiner bzw. homogener für Progenitorzellen. Dieses Phänomen ist auch für humane Zellen beschrieben: Tondreau isolierte mononukleäre Zellen (MNC) aus humanem Knochenmark (KM), Nabelschnurblut (CB) und mobilisiertem peripheren Blut (MPB). In der P0-Kultur hatten sich keine CFU gebildet, nach zwei Passagen erreichte jedoch die Zahl der Kolonien bei allen drei Zellpopulationen mit dem KM vergleichbare Werte. Zudem untersuchte Tondreau die Transkription von *Oct4*, einem Transkriptionsfaktor, welcher sowohl in embryonalen Stammzellen als auch (in geringerem Ausmaß) in adulten multipotenten Progenitorzellen nachweisbar ist. *Oct4* ließ sich nicht in der P0-Kultur nachweisen, dafür aber in der P2-Kultur aller untersuchter MSC (Tondreau et al., 2005). Diese Ergebnisse sprechen für die Anreicherung von multipotenten Progenitor-/Stammzellen im Nabelschnur- und peripheren Blut.

Yazid unterschied zwei Zellpopulation in der mononukleären Zellkultur: Adhärente Zellen und Zellen in Suspension. Die zweite Gruppe erwies sich in seinen Untersuchungen u.a. als Population primitiver hämatopoetischer Vorläuferzellen (Yazid et al., 2011). Vergleichbare Verhältnisse könnten auch für das Schaf gelten: Neben fibroblastoiden, adhärennten Zellen fanden sich in der vorliegenden Studie kleinere runde Zellen in der Suspension. Diese wurden

jedoch nicht weiter untersucht, sondern mit dem jeweiligen Überstand bei jedem Mediumwechsel entsorgt. Die Annahme, dass es sich um hämatopoetische Stammzellen handeln könnte, steht mit der Feststellung im Einklang, dass sich der Anteil der CD34-positiven Zellen, ein Marker für hämatopoetische Progenitoren, zwischen den ersten Passagen stark reduziert hat. Ein geringer Teil dieser Zellen wurde möglicherweise beim Passagieren miterfasst und in die nachfolgende Kultur aufgenommen, was die noch messbare Fraktion erklären würde.

Der positive Nachweis erfolgte mittels CD44, CD105 (Endoglin) und CD90. Dabei zeigten sich ein durchgehend hoher Anteil an CD44- und ein geringerer Anteil an CD105-positiven Zellen. CD90 war in den Passagen 1 und 3 des peripheren Blutes kaum und in der Passage 0 nur geringfügig nachweisbar (s. Tab. 9). Kern stellte bei einem Vergleich von drei humanen MSC-Quellen (KM, Nabelschnurblut und Fettgewebe) signifikante Unterschiede sowohl in der primären MSC-Ausbeute und Replikationsrate als auch in der Expression einiger CD-Marker, im Speziellen CD90, CD105 und CD106, fest. Dabei wiesen CB-MSC niedrigere Werte bezüglich der Oberflächenmarker im Vergleich zu den beiden Vergleichspopulationen auf (Kern et al., 2006). Kuznetsov untersuchte humane PB-MSC und stellte fest, dass diese im Gegensatz zur Vergleichsgruppe aus dem KM kein CD105 und Stro-1 exprimierten (Kuznetsov et al., 2001). Aus den Darstellungen wird ersichtlich, dass die *Nische* mit ihrem einzigartigen Mikromilieu einen entscheidenden Beitrag zur Biologie der MSC leistet. Individualisierte Analyse-Systeme für die einzelnen Zellpopulationen sind daher notwendig.

Einige Autoren beschreiben zudem das Vorhandensein von verschiedenen Zellpopulationen, welche sich sowohl morphologisch als auch im Oberflächenmarkerprofil deutlich unterscheiden (Muraglia et al., 2000; Erices, Conget and Minguell, 2000; Chang et al., 2006). So hat Chang zwei Zellpopulationen aus dem humanen Nabelschnurblut isoliert, die bis auf CD90, für das eine der Populationen komplett negativ war, in allen Markern übereinstimmten. Beide Populationen wiesen die gleiche hohe Proliferationsrate sowie osteogenes und chondrogenes Differenzierungspotenzial auf. Die CD90-positive Population zeigte zusätzlich adipogenes Potenzial, welches der zweiten Population fehlte (Chang et al., 2006). Folglich muss man annehmen, dass das gemessene Oberflächenmarkerprofil einer Zellkultur mit dem Anteil der darin enthaltenen Populationen variiert.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden morphologisch unterschiedliche Zellen in der (unstimulierten) Zellkultur mit zwei unterschiedlichen Zelltypen detektiert: Spindelförmige und breite, abgeflachte Zellen (s. Abb. 12). Die MSC des Schafes sind wahrscheinlich keine einheitliche Gruppe. Möglicherweise lässt sich damit die Inhomogenität bezogen auf die CD-Markerprofile erklären, die auch von den oben genannten Autoren beschrieben wurde.

Vergleicht man die beiden Zellkulturen der Passage 3 aus dem Nabelschnurblut und dem peripheren Blut sind beide in gleichem Maße negativ für die hämatopoetischen Marker. Der Anteil an CD105- und CD90-positiven Zellen liegt bei der CB-Kultur höher. In Anbetracht der obigen Darstellungen ist die Bedeutung dieser Ergebnisse nicht eindeutig: Sie könnten entweder als ein höherer Stammzellanteil im Nabelschnurblut oder als eine vom peripheren Blut differente Zusammensetzung der Zellpopulation interpretiert werden. Im Vergleich zum Knochenmark ist eine niedrige Stammzellausbeute für das Nabelschnurblut beschrieben: Erices erhielt in ihren Untersuchungen an humanem Nabelschnurblut im Mittel sieben Kolonien (CFU) aus 25 Mio. mononukleärer Zellen (Erices et al., 2000). Für das periphere Blut gelten ähnlich niedrige Werte: Kuznetsov erhielt je nach Spezies (Maus, Kaninchen, Schwein) zwischen 0,18 und 2,7 CFU auf 1×10^6 Zellen (Kuznetsov et al., 2001). Allerdings sind die USSC für ihr enormes Wachstumsvermögen bekannt, welches dasjenige der KM- und Fettgewebe-MSC übersteigt (Yang et al., 2004; Kern et al., 2006; Kögler et al., 2006; Shetty, Cooper and Viswanathan, 2010). Es gibt Angaben zur mittleren Verdopplungszeit von 44-48 Stunden, im Vergleich zu 85 Stunden beim KM (Erices et al., 2000; Shetty et al., 2010). Zvaifler gibt Verdopplungszeiten von 2,5 Tagen für MSC aus peripherem Blut an (Zvaifler et al., 2000). Meine Beobachtungen zum peripheren ovinen Blut stehen mit diesen Angaben im Einklang: Bei einer durchschnittlichen Ausgangsdichte von 3×10^4 Zellen pro cm^2 kam es nach $6 \pm 2,5$ Tagen zu einer nahezu 100 %-igen Konfluenz. In dieser Zeit verdreifachte sich die Zellzahl, in einer Kultur (Schaf 8 P1) kam es sogar zu einer Verzehnfachung (Daten nicht dargestellt). Eine interindividuell unterschiedliche Proliferationsrate der MSC beim Schaf ist anzunehmen. Hinzu kommt die besondere Eigenschaft der USSC ihre Proliferationskapazität bis zu 20 Passagen beizubehalten (Kögler et al., 2006; Degistirici et al., 2008). Insofern sollte sich die Qualitätsbeurteilung einer bestimmten Entnahmekette nicht auf die anfängliche Zellausbeute beschränken.

Zudem stellt sich die Frage, wie viele Stammzellen notwendig sind, um einen klinischen Benefit zu erreichen. Horwitz untersuchte Knochen-, KM- und Hautbiopsien von Kindern mit *Osteogenesis imperfecta* acht Wochen nach mehrmaliger systemischer MSC-Infusion. In keinem der Biopsate wurden mehr als 1% markierter Zellen (bezogen auf die Ausgangszahl) gemessen, der klinische Benefit war jedoch signifikant (Horwitz et al., 2002). Auch Kuznetsov konnte trotz der sehr geringen MSC-Ausbeute aus peripherem Blut (s. oben) bei lokaler Anwendung eine Knochenformation in der Subkutis von Mäusen erzeugen (Kuznetsov et al., 2001). Möglicherweise wird durch die Zytokinsekretion der transplantierten Zellen ein Mikromilieu geschaffen, welches die interne Osteogenese stimuliert. Die exakten *in vivo*-Mechanismen müssen noch erforscht werden, wie dies z.T. bereits für die Osteogenese nach Trauma erfolgt ist (s. Abb.4).

In fast allen aufgeführten Arbeiten zum peripheren Blut und Nabelschnurblut wurde keine Aufschlüsselung in die einzelnen Zellpassagen durchgeführt. Kern hat zwar mehrere Zellpassagen untersucht, hat aber anschließend einen Mittelwert gebildet, sodass die Verlaufsentwicklung der Oberflächenmarker nicht mehr nachvollziehbar ist (Kern et al., 2006). Aufgrund der niedrigen Tierzahl pro Ansatz kann ich leider keine quantitative Aussage zum Verlauf machen, allerdings stellt die Aufschlüsselung in die aufeinanderfolgenden Passagen die einzige Möglichkeit dar, um mehr über die Entwicklung der Oberflächenmarker *in vitro* und damit die Entwicklung der Zellen zu verstehen.

Die gemessene Expression der CD-Marker verändert sich nicht nur von Passage zu Passage, sondern schwankt auch von Tier zu Tier. Diese interindividuellen Schwankungen sind auch von Peister beschrieben. Sie hat fünf verschiedene Mausstämme untersucht und Unterschiede nicht nur bei den Oberflächenmarkern, sondern auch in der Proliferationsrate und im Differenzierungspotenzial festgestellt (Peister et al., 2004). Peister verwendete unterschiedliche Kulturmedien für die einzelnen Stämme, die sich auf die Wachstumsrate auswirkten. Eine Veränderung der Oberflächenmarker durch Kulturmediumzusätze ist von Derzic bereits beschrieben, sodass ein bias nicht ausgeschlossen ist (Derzic, Slone and Sender, 2005). In der aktuellen Studie wurde die gleiche Zusammensetzung des Mediums für alle Proben verwendet. Es muss daher weitere Faktoren geben, die das unterschiedliche biologische

Verhalten von MSC, nicht nur zwischen Mensch und Tier, sondern auch innerhalb einer Spezies bedingen.

Aus den obigen Darstellungen wird ersichtlich, dass die Relevanz der CD-Oberflächenmarker für den Nachweis und die Qualitätsprüfung der MSC bislang nicht eindeutig definiert ist und weitere Untersuchungen notwendig sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen auf die Notwendigkeit hin, für die unterschiedlichen MSC-Quellen eigene Standards zu entwickeln.

Ein weiteres anzugehendes Problem ist die Verfügbarkeit der Antikörper: Nicht alle Antikörper standen für die Spezies Schaf zur Verfügung, sodass einige humane Antikörper verwendet werden mussten (CD34, CD14, CD105, CD73 und CD90). Bis auf CD73 haben alle Antikörper in Vorversuchen eine Kreuzreaktivität mit den Schafszellen gezeigt und konnten eingesetzt werden. Im Gegensatz zu Kleintieren wie Maus oder Kaninchen, ist die Auswahl an verfügbaren Antikörpern für das Schaf äußerst eingeschränkt und erschwert durchflusszytometrische Analysen an diesem Tiermodell.

4.2.2 Inkubationsbedingungen und Plastizität

Die Relevanz der CD-Marker für den Nachweis der MSC ist mit zunehmendem Wissen gewachsen. Dennoch bleibt der Goldstandard weiterhin die *in vitro*-Testung des Differenzierungspotenzials. In der vorliegenden Arbeit wurden dafür sowohl immunzytochemische Methoden als auch die Polymerasekettenreaktion herangezogen. Da nicht nur eine qualitative sondern auch eine quantitative Analyse durchgeführt werden sollte, um das Differenzierungsverhalten der Zellen im zeitlichen Verlauf zu sehen, wurden die Untersuchungen an zwei getrennten Kinetikpunkten gemacht: An Tag 10 und Tag 21 der Inkubation. Das ist nach meinem Kenntnisstand der erste gesicherte Nachweis von ovinen PB-MSC.

In der vorliegenden Studie wurden die gängigen Differenzierungsprotokolle verwendet, welche sich bereits über Jahre bewährt haben (Pittenger et al., 1999b). Uneinigkeiten bestehen in der Wahl des optimalen Nährmediums und der Anwendung des fetalen Kälberserums (FBS). Jäger et al. haben in ihrer vergleichenden Studie gezeigt, dass nicht jedes Medium für jede Zellpopulation

gleich gute Bedingungen schafft: *MesenCult*TM führte zu den besten Ergebnissen in der osteogenen Differenzierung von KM-MSC, bei USSC zeigte jedoch die mit *DMEM-low glucose* (welches ich ebenfalls verwendete) inkubierte Kultur die meisten Osteoblasten. Das verwandte Produkt *DMEM-high glucose*, welches einen höheren Glukosegehalt und kein Pyruvat enthält, schnitt im Vergleich schlechter ab. Möglicherweise sind es die supportiven Eigenschaften des Pyruvat, welche die Energiegewinnung der Zellen während der Differenzierung vorantreiben (Jäger et al., 2003). Für das osteogene Protokoll hat sich inzwischen die Supplementierung des *DMEM* mit 20-30 % FBS (zusätzlich zum DAG) durchgesetzt (Zvaifler et al., 2000; Kuznetsov et al., 2001; Jäger et al., 2009b). Einige Autoren bevorzugen jedoch die 10 %-ige Lösung (Pittenger et al., 1999b; Fan et al., 2009a). Die optimale FBS-Konzentration für das adipogene Protokoll ist noch weniger eindeutig. Im chondroblastären Protokoll verzichtet man komplett auf Seren und verwendet stattdessen das *ITS-Premix*, einen Serumersatz mit Insulin, Transferrin und Selensäure. In der vergleichenden Studie von Awad wurden nur unter Mitwirkung von TGF- β signifikante Unterschiede in der Proliferation und Proteinsynthese zwischen den jeweils mit ITS- und FBS-supplementierten Kulturen verzeichnet (Awad et al., 2003). In meinen Vorversuchen habe ich allerdings festgestellt, dass ein abrupter Wechsel von FBS auf ITS-Premix zu einem Proliferationsstopp und einem schlechten Anwachsen der Zellen führt. Daher wurde vor der chondrogenen Inkubation eine schrittweise FBS-Reduktion durchgeführt (Daten nicht dargestellt). Bei den Vorversuchen wurde eine an die jeweilige Zellpopulation angepasste FBS-Konzentration herausgearbeitet: 20 % für die anfängliche Anzucht der Zellen sowie 15 % für das osteogene und 10 % für das adipogene Protokoll.

Da es keine abschließende Beantwortung der Frage nach der optimalen Konzentration gibt, sollte bei jeder Studie die für die jeweilige Zellkultur optimale Nähr- und Inkubationslösung herausgearbeitet werden.

Bei Anwendung im humanen System muss über den Einsatz von (autologen/allogenen) humanen Seren nachgedacht werden, da hierdurch das Risiko einer Prioneninfektion sowie einer Immunreaktion des Empfängers reduziert bzw. vermieden werden kann (Turnovcova et al., 2009). Dahl hat zudem gezeigt, dass das autologe Serum Vorteile gegenüber dem FBS aufweist, wenn es um die genetische Stabilität unter Zellkulturbedingungen geht (Dahl et al., 2008).

Bezogen auf das Differenzierungspotenzial und die Zellalterung gibt es, laut aktueller Studie von Bieback, keine signifikanten Wirkunterschiede zwischen den beiden Serumtypen (Bieback et al., 2012).

Die Angaben zu der optimalen Aussaatdichte differieren: Je nach Autor und Differenzierungstyp sind für USSC Dichten von 3×10^3 bis 3×10^5 Zellen pro cm^2 beschrieben (Jäger et al., 2004; Degistirici et al., 2008; Fan et al., 2009a; Shetty et al., 2010; De Schauwer et al., 2011). Beim peripheren Blut gibt es kaum explizite Angaben dazu (Zvaifler et al., 2000; Chong et al., 2011). Die breite Streuung lässt auch hier die sehr individuelle Biologie der MSC unterschiedlichen Ursprungs (sowohl Spezies als auch *Nische*) vermuten. Aber auch das Differenzierungsprotokoll scheint eine wichtige Rolle zu spielen: Um eine chondrogene Differenzierung der MSC zu erreichen, wird durchweg eine höhere Zelldichte benötigt als für die osteogene und adipogene Differenzierung, so auch in dieser Studie festgestellt. Viele Autoren verwenden statt einer herkömmlichen Zellkultur ein 3D-Konstrukt in Form eines einfachen Zellpellets oder als Alginatmikroperlen (Degistirici et al., 2008; Shetty et al., 2010; Zhang et al., 2011; Chong et al., 2011). Li untersuchte das 2D- und 3D-System in der Chondrogenese und stellte in der immunhistochemischen und PCR-Analyse fest, dass beide Systeme in vergleichbarem Maße eine chondrogene Differenzierung ermöglichen (Li et al., 2009). Eingehendere Untersuchungen sind notwendig, um Standards zu schaffen und die Vergleichbarkeit der Studien zu gewährleisten.

In Vorversuchen wurde die optimale Aussaatdichte für die PB-MSC untersucht: Eine Dichte von 200 Zellen/ cm^2 bei dem osteo- und adipogenen Protokoll und 500 Zellen/ cm^2 bei dem chondrogenen Protokoll stellte sich als ausreichend heraus, entgegengesetzt zu der hohen Aussaatdichte der USSC (Jäger et al., 2004). Neuhuber (Neuhuber et al., 2008) ist in der explizit auf Zelldichte ausgerichteten Studie zu KM-MSC von Ratten auf ein ähnliches Ergebnis gekommen, Turnovcova (Turnovcova et al., 2009) wählte sogar eine Dichte von 150 Zellen/ cm^2 bei etwas größeren humanen MSC. Das zeigt erneut die enorme Proliferationskapazität der Zellen.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die MSC, welche aus dem peripheren Blut von Schafen isoliert wurden, bei entsprechender Stimulation in die drei mesenchymalen Zelllinien differenzieren können. Bereits innerhalb der ersten zehn Tage waren morphologische Veränderungen der Zellen

sichtbar: Es entwickelten sich *Bone nodules*, Fettvakuolen und 3D-Konstrukte, wie sie auch in den oben zitierten Arbeiten für USSC und KM-MSC beschrieben sind (Pittenger et al., 1999b; Jäger et al., 2004; Degistirici et al., 2008). Am Tag 10 der Inkubation waren bereits die meisten immunzytochemischen Differenzierungsmarker nachweisbar. Die Kontrollen veränderten im Gegensatz zu den stimulierten Kulturen ihre fibroblastoide Form nicht, waren aber für einige Marker in einem geringeren Ausmaß positiv, so v.a. für die adipogenen Marker PPAR γ und Adiponectin. Eine spontane adipogene Differenzierung geben auch Chong und Kuznetsov für ihre MSC-Populationen an (Kuznetsov et al., 2001; Chong et al., 2011). Diese ist möglicherweise auf eine serumbedingte Induktion zurückzuführen, welche für das Kaninchen-Serum, aber auch für das FBS beschrieben ist. Allerdings kam es in der Kontrollgruppe nie zu einer Entwicklung von Fettvakuolen (s. Abb. 24). Ähnliches gilt für die spontane osteogene Differenzierung: Am Tag 10 der Stimulation erkennt man auch in der Kontrollgruppe eine diffus ausgeprägte alkalische Phosphatase (AP), obgleich diese schwächer ausfiel als in der osteogen stimulierten Kultur. Das Phänomen wurde auch bei Nabelschnurblutzellen beschrieben und kann möglicherweise auf das *DMEM-low glucose*, als potenter Induktor osteoblastärer Differenzierung, zurückgeführt werden (Jäger et al., 2003, 2004; Degistirici et al., 2008).

Die Anfärbbarkeit des chondrogenen Markers Cartilage Proteoglycan blieb über beide Kinetikpunkte relativ konstant. Die Expression von Collagen II sowie die Transkription des Aggrecan, als wichtigstes Proteoglykan des Knorpels, nahmen zu. Im Gegensatz dazu waren die Chondroitinsulfate erst am Tag 21 mit Safranin O anfärbbar, besonders intensiv in Bereichen von Zellclustern (s. Abb. 22). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Tendenz der Chondroblasten/-zyten zur Ausbildung dreidimensionaler Zellaggregate, die am Tag 10 nur vereinzelt vorlagen. Allerdings hat Chong bereits darauf hingewiesen, dass Safranin O nicht optimal für quantitative Analysen ist, da das Chondroitinsulfat erst bei sehr hohen extrazellulären Konzentration stöchiometrisch gebunden wird (Chong et al., 2011). Die Alcianblau-PAS Färbung der knorpelspezifischen Glykosaminoglykane nahm mit andauernder Inkubation zu, während die Kontrollgruppe nur für neutrale Mucopolysaccharide positiv blieb.

Vergleicht man die beiden Kinetikpunkte in den osteogenen Reihen, sieht man keine deutliche Vermehrung von Osteocalcin, einem von Osteoblasten

gebildeten Protein, das den Aufbau der Knochenmatrix steuert. Dieses war bereits am Tag 10 deutlich exprimiert. Für den indirekten Nachweis der Differenzierung wurde zusätzlich die Expression von *Rank* getestet: Dieses Protein nimmt zusammen mit seinem Liganden *Rankl* eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel ein. Es wird als Rezeptor an der Oberfläche von Osteoklasten-Progenitorzellen exprimiert und führt über die Bindung des *Rankl*, welches von Osteoblasten gebildet wird, zur Ausdifferenzierung der Osteoklasten (Nakashima et al., 2011). Die Osteoklasten selbst stammen von der hämatopoetischen Zellreihe ab. Diese ist, wie anhand der Durchflusszytometrie erkennbar, zu einem geringen Anteil in der kultivierten Zellpopulation vertreten. Für die Differenzierung zu Osteoklasten ist die Zell-zu-Zell Kommunikation mit Osteoblasten unabdingbar (Nakashima et al., 2011). Die minimale *Rank*-Expression in der unstimulierten Kultur ist möglicherweise auf die spontane Osteogenese zurückzuführen, wohingegen die osteogene Inkubation deutlich die Osteoblastendifferenzierung und damit auch die Osteoklastogenese vorantreibt. Im Laufe der osteogenen Differenzierung verschiebt sich die Zytokin- und Hormonbalance und es kommt zum Abfall einiger Zytokine, u.a. des IL-6, aber auch vieler weiterer Botenstoffe (s. Kap. 1.4.4). Dadurch kommt es über eine komplexe Verkettung u.a. zur Osteoklasteninhibition (Udagawa et al., 1995; Jäger et al., 2009b). Ein wichtiges Regulatorprotein in diesem Zusammenhang ist das *Osteoprotegerin*, welches von Osteoblasten gebildet wird und über eine Blockierung des *Rankl* seine Interaktion mit *Rank* verhindert. Die Bildung von *Osteoprotegerin* wird wiederum durch das Zytokin-Hormon-System gesteuert (Kostenuik and Shalhoub, 2001). Dieser Sachverhalt steht möglicherweise im Einklang mit der abfallenden Tendenz von *Rank* zwischen den Kinetikpunkten.

Die Transkription von Collagen I war an beiden Kinetikpunkten stark ausgeprägt. Valenti zeigte in ihrer Studie zur Osteogenese von humanen PB-MSC, dass die Transkription von Collagen I bereits vor Beginn der osteogenen Stimulation nachweisbar ist. Es gehört zu den frühen osteoblastären Markern und wird über die gesamte Dauer der Differenzierung gebildet (Valenti et al., 2008). Der Nachweis von Osteocalcin in der USSC-Kultur fiel am Tag 10 schwächer aus als im peripheren Blut. Da nur eine geringe Anzahl an Nabelschnurblutproben untersucht wurde, ist eine quantitative Analyse hier nicht möglich, allerdings kann das ein Hinweis darauf sein, dass die USSC unreifere Vorstufen im Vergleich zu

PB-MSCs sind und daher längere Inkubationszeiten benötigt werden, um eine Ausdifferenzierung zu erreichen. So erfolgt in der Mehrheit der Studien zum Nabelschnurblut der Osteogenesenachweis nach mindestens 2,5-wöchiger Inkubation (Kern et al., 2006; Degistirici et al., 2008; Shetty et al., 2010; Zhang et al., 2011; De Schauwer et al., 2011).

Die adipogen stimulierten Zellreihen zeigten mitunter die stärksten Veränderungen im Expressionsmuster zwischen den letzten beiden Kinetikpunkten. V.a. das Adiponectin stellte sich am Tag 21 der Stimulation deutlich intensiver dar, genauso wie die Fettvakuolen, welche erst dann eine ausreichende Größe erreicht hatten, um mit Ölrot O nachgewiesen werden zu können. Zu dem adipogenen Potenzial von MSC gibt es unterschiedliche Angaben: Im Gegensatz zu MSC, die aus dem Knochenmark und Fettgewebe isoliert werden und durchweg unter Stimulation adipozytär ausdifferenzieren können, wird USSC nur ein geringes bis gar kein adipogenes Potenzial nachgesagt. Zhang gibt einen Anteil von nur knappen 9% (4/45) aller untersuchten CB-Populationen an, die nach dreiwöchiger Inkubation Ölrot O-gefärbte Fettvakuolen aufwiesen (Zhang et al., 2011). Shetty (Shetty et al., 2010) und Kern (Kern et al., 2006) konnten keinerlei adipozytäre Differenzierung in den CB-Kulturen nachweisen. Bei MSC-Populationen aus peripherem Blut sind die Ergebnisse ebenfalls nicht eindeutig: Chong erreichte bei PB-MSCs keine adipogene Differenzierung nach 14 Tagen, wohl aber bei KM-MSCs (Chong et al., 2011). Valenti wies wiederum nach achttägiger Stimulation Ölrot O-positive Fettvakuolen und PPAR γ -Transkription nach (Valenti et al., 2008). Möglicherweise sind diese unterschiedlichen Ergebnisse auf die unterschiedlichen Basismedien zurückzuführen, wie es bereits für die Osteogenese beschrieben wurde (s. oben), denn sowohl Shetty als auch Zhang verwendeten *DMEM-high glucose* als Basismedium. Degistirici et al 2008 (Degistirici et al., 2008) und De Schauwer (De Schauwer et al., 2011) erreichten Adipogenese in USSC-Kulturen auf der Basis von *DMEM-low glucose*, Valenti (Valenti et al., 2008) verwendete *MesenCult™* bei PB-MSCs. In der vorliegenden Studie haben sowohl alle PB- als auch die beiden CB-Populationen deutliche adipogene Differenzierung gezeigt, sowohl immunzytologisch als auch in der PCR-Analyse. Die Adipogenese scheint in jedem Fall eine besondere Rolle im Differenzierungspotenzial mesenchymaler Progenitorzellen einzunehmen. Muraglia beschrieb das sog. *Hierarchie-Modell*,

wonach der adipogene Zweig sich als erstes abspaltet und somit einige CFU-F unter Kulturbedingungen ihre adipogene Potenz unter Erhalt der chondrogen-osteogenen Potenz verlieren (Muraglia et al., 2000). Im Einklang mit dieser Hypothese stehen die Ergebnisse von Karystinou, die 21 synoviale MSC-Populationen untersucht hat, von den nur sieben adipogen ausdifferenzierten (Karystinou et al., 2009). Möglicherweise lassen sich diese Beobachtungen mit der Heterogenität der MSC-Klone erklären, die u.a. Kern für das Nabelschnurblut aufzeigten: USSC-Populationen wiesen sowohl den größten Anteil an Zellseneszenz in den frühen Passagen (verglichen mit MSC aus KM und Fettgewebe) als auch an Populationen mit der längsten Kultivierungsperiode auf (Kern et al., 2006). Eine solche Heterogenität wurde in der vorliegenden Arbeit bei der unterschiedlichen Populationsverdopplungszeit der PB-MSC festgestellt (s. Kap.4.2.1). Weiterführende Untersuchungen zum Proliferations- und Plastizitätspotenzial von PB-MSC über längere Kultivierungsperioden sind erforderlich, um die Ergebnisse in Relation zu den verwandten Zellreihen anderen Ursprungs zu setzen.

Insgesamt sollte beachtet werden, dass die *in vitro*-Nachweise der Differenzierung nicht ohne Weiteres auf die *in vivo* Situation übertragbar sind: Trotz der zahlreich aufgezeigten osteogenen Potenz von KM-MSC bildeten nur 60% der CFU-F Knochen nach *in vivo*-Transplantation aus, wohingegen alle multiklonalen Populationen in der Lage dazu waren (Kuznetsov et al., 1997). Dies spricht zum einen dafür, dass der klinische Einsatz monoklonaler Populationen neben dem kost- und zeitaufwendigen Aspekt zusätzlich ineffizient sein könnte. Zum anderen legt es nahe, dass Methoden zur prospektiven Analyse der Differenzierungspotenz von MSC sowohl zu einer Standardisierung und besseren Studienvergleichbarkeit als auch zum besseren Outcome des klinischen Einsatzes der Transplantate führen würden. Eine solche Methode, basierend auf zwei Biomarkern (Collagen I und Osteoprotegerin), hat De Bari an periostalen und synovialen MSC entwickelt (De Bari et al., 2008). Abgesehen von der niedrigen getesteten Populationszahl (jeweils n=4) und der ausschließlichen Anwendung am Knochenmodell, stellt diese Methode einen vielversprechenden Ansatz für das oben beschriebene Problem dar.

5 Konklusion und Zukunftsausblick

In der vorliegenden Studie wurde das periphere Blut von jungen Schafen auf sein Potenzial als Quelle mesenchymaler Progenitorzellen untersucht. Das Schafsmodell gilt als besonders gut geeignet für die muskuloskelettale *Tissue engineering* Forschung. Daher sollten bessere Voraussetzungen für die *in vitro*-Forschung an dieser Spezies angestrebt werden, u.a. die Entwicklung monoklonaler Antikörper.

Es konnten adhärente Zellen aus der mononukleären Population des peripheren Blutes isoliert werden, die ein osteogenes, adipogenes und chondrogenes Differenzierungspotenzial aufwiesen. Es wurden die gleichen Methoden und Kultur-/Inkubationsmedien verwendet, die sich für andere MSC-Quellen, wie Knochenmark und Nabelschnurblut, bewährt haben. Wie bereits in vorangegangenen Studien gezeigt, sind für die einzelnen Zellreihen jeweils individualisierte Protokolle notwendig. Unterschiede zeigten sich u.a. in der benötigten Ausgangsdichte, in der Proliferationsrate und in den Oberflächenmarkern. Aufgrund der niedrigen Anzahl der getesteten CB-Proben und der Tierzahl insgesamt lässt sich nur eine Tendenz bezüglich des Vergleichs beider MSC-Quellen beschreiben. Weitere Untersuchungen zum peripheren Blut sollten folgen, um quantitative Aussagen treffen zu können. Zudem sind *in situ*-Marker für diese Zellpopulation notwendig, damit der Nachweis auch prospektiv erfolgen kann. Möglicherweise wird es dadurch möglich sein, die Herkunft der zirkulierenden Stammzellen zu erfassen.

Die Zellpopulationen aus dem peripheren Blut zeigten eine ähnliche Heterogenität wie sie für die USSC-Populationen beschrieben ist. Es gibt bislang keinen Konsens darüber, welche physiologische Bedeutung diese Heterogenität hat.

Insgesamt stellt das periphere Blut eine vielversprechende und leicht zugängliche Quelle für MSC dar. Es sollten weitere *in vitro* und *in vivo* Studien zur Charakterisierung dieser Quelle folgen, damit das periphere Blut möglicherweise einen Platz neben anderen Quellen, wie Knochenmark, Fettgewebe und Nabelschnurblut einnimmt.

6 Zusammenfassung

Einleitung: Im Gegensatz zum Einsatz embryonaler Stammzellen ist der Einsatz von Progenitorzellen aus dem Nabelschnurblut (CB) auf dem orthopädischen Fachgebiet möglich. Multipotente, mesenchymalen Progenitorzellen (MSC) sind zwar auch im erwachsenen Organismus in zahlreichen Geweben (u. a. im peripheren Blut (PB), Knochenmark, Fettgewebe) nachweisbar, sind jedoch v.a. in der Anzahl begrenzt. In jüngster Vergangenheit wurden MSC auch im ovinen Nabelschnurblut (USSC) nachgewiesen. In dieser *vitro*-Studie wurde untersucht, ob bei dieser Spezies neben den im Nabelschnurblut nachgewiesenen MSC auch im peripheren Blut Progenitoren existieren.

Methoden: Aus dem peripheren Blut (PB) von sechs Schafen und aus dem Nabelschnurblut von zwei Schafen erfolgte die Isolation, Kultivierung und Expansion mononukleärer Zellen. Nach der Passagierung wurde der Anteil der MSC mittels Durchflusszytometrie detektiert und quantifiziert (CD34-/45-/14-/CD44+/90+/105+). Die Zellen wurden osteogen, chondrogen und adipogen stimuliert. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrollgruppe. Nach jeweils 10 und 21 Tagen Inkubation wurde der Differenzierungsstatus morphologisch, (immun-)zytochemisch (Adiponectin, PPAR, Ölrot O, Osteocalcin, Rank, Alkalische Phosphatase, Cartilage Proteoglycan, Collagen 2, Safranin O, Alzianblau-PAS) und molekularbiologisch mittels RT-PCR (Collagen 1, PPAR, Aggrecan) erhoben.

Ergebnisse: In allen PB-Proben wurden MSC durchflusszytometrisch nachgewiesen. Es zeigte sich eine deutlich stärkere Expression der jeweiligen zelllinientypischen Parameter im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe, wobei auch diese eine geringe Differenzierungstendenz aufwies. Die Expression von CD105 und CD90 fiel in der CB-Population höher aus als in der PB-Gruppe. (Immun-)zytochemisch unterschieden sich Progenitorzellen aus CB und PB weitestgehend nicht voneinander.

Konklusion: Das PB von jungen Schafen beinhaltet MSC, ähnlich dem CB der gleichen Spezies. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um diese leicht zugängliche Quelle für die Tissue engineering-Forschung zu etablieren. Der Schwerpunkt sollte im Bereich der monoklonalen Antikörper und in situ-Marker gesetzt werden, da diese für die Spezies Schaf bisher nur vereinzelt verfügbar sind.

7 Literaturverzeichnis

1. Aerssens, J., Boonen, S., Lowet, G. and Dequeker, J. (1998) Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology*, **139**, 663–670.
2. Akay, I., Oxmann, D., Helfenstein, A., Mentlein, R., Schünke, M., Hassenpflug, J., Kurz, B. (2010) Tumor risk by tissue engineering: cartilaginous differentiation of mesenchymal stem cells reduces tumor growth. *Osteoarthritis Cartilage*, **18**, 389–396.
3. Alaoui-Ismaili, M.H. and Falb, D. (2009) Design of second generation therapeutic recombinant bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **20**, 501–507.
4. Augello, A., Kurth, T.B. and De Bari, C. (2010) Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur. Cell. Mater.*, **20**, 121–133.
5. Awad, H.A., Halvorsen, Y.-D.C., Gimple, J.M. and Guilak, F. (2003) Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng.*, **9**, 1301–1312.
6. Axelrad, T.W. and Einhorn, T.A. (2009) Bone morphogenetic proteins in orthopaedic surgery. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **20**, 481–488.
7. Barry, F., Boynton, R.E., Liu, B. and Murphy, J.M. (2001) Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp. Cell Res.*, **268**, 189–200.
8. Battula, V.L., Bareiss, P.M., Treml, S., Conrad, S., Albert, I., Hojak, S., Abele, H., Schewe, B., Just, L., Skutella, T. (2007) Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differ. Res. Biol. Divers.*, **75**, 279–291.
9. Behzad-Behbahani, A., Pouransari, R., Tabei, S.Z., Rahiminejad, M.S., Robati, M., Yaghobi, R., Nourani, H., Ramzi, MM. Farhadi-Andarabi, A., Mojiri, A., Rahsaz, M., Banihanshemi, M., Zare, N. (2005) Risk of viral transmission via bone marrow progenitor cells versus umbilical cord blood hematopoietic stem cells in bone marrow transplantation. *Transplant. Proc.*, **37**, 3211–3212.
10. Bianco, P., Robey, P.G. and Simmons, P.J. (2008) Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell*, **2**, 313–319.
11. Bieback, K., Hecker, A., Schlechter, T., Hofmann, I., Brousos, N., Redmer, T., Besser, D., Klüter, H., Müller, AM., Becker, M. (2012) Replicative aging and differentiation potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells expanded in pooled human or fetal bovine serum. *Cytotherapy*.
12. Bobis, S., Jarocha, D. and Majka, M. (2006) Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem. Cytobiol. Pol. Acad. Sci. Pol. Histochem. Cytochem. Soc.*, **44**, 215–230.

13. Bohm, E.R., Dunbar, M.J. and Bourne, R. (2010) The Canadian Joint Replacement Registry-what have we learned? *Acta Orthop.*, **81**, 119–121.
14. Burkus, J.K., Heim, S.E., Gornet, M.F. and Zdeblick, T.A. (2004) The effectiveness of rhBMP-2 in replacing autograft: an integrated analysis of three human spine studies. *Orthopedics*, **27**, 723–728.
15. Calori, G.M., Mazza, E., Colombo, M., Mazzola, S., Mineo, G.V. and Giannoudis, P.V. (2014) Treatment of AVN using the induction chamber technique and a biological-based approach: indications and clinical results. *Injury*, **45**, 369–373.
16. Calori, G.M., Phillips, M., Jeetle, S., Tagliabue, L. and Giannoudis, P.V. (2008) Classification of non-union: need for a new scoring system? *Injury*, **39 Suppl 2**, S59–63.
17. Campagnoli, C., Roberts, I.A., Kumar, S., Bennett, P.R., Bellantuono, I. and Fisk, N.M. (2001) Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, **98**, 2396–2402.
18. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2002) Update: allograft-associated bacterial infections--United States, 2002. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, **51**, 207–210.
19. Chang, Y.-J., Tseng, C.-P., Hsu, L.-F., Hsieh, T.-B. and Hwang, S.-M. (2006) Characterization of two populations of mesenchymal progenitor cells in umbilical cord blood. *Cell Biol. Int.*, **30**, 495–499.
20. Chen, N., Kamath, S., Newcomb, J., Hudson, J., Garbuzova-Davis, S., Bickford, P., Davis-Sanberg, C., Sanberg, P., Zigova, T., Willing, A. (2007) Trophic factor induction of human umbilical cord blood cells in vitro and in vivo. *J. Neural Eng.*, **4**, 130–145.
21. Chen, N., Newcomb, J., Garbuzova-Davis, S., Davis Sanberg, C., Sanberg, P.R. and Willing, A.E. (2010) Human Umbilical Cord Blood Cells Have Trophic Effects on Young and Aging Hippocampal Neurons in Vitro. *Aging Dis.*, **1**, 173–190.
22. Cho, P.S., Messina, D.J., Hirsh, E.L., Chi, N., Goldman, S.N., Lo, D.P., Harris, I.R., Popma, S.H., Sachs, D.H., Huang, C.A (2008) Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells. *Blood*, **111**, 430–438.
23. Chong, P.-P., Selvaratnam, L., Abbas, A.A. and Kamarul, T. (2011) Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.*
24. Conboy, I.M., Conboy, M.J., Wagers, A.J., Girma, E.R., Weissman, I.L. and Rando, T.A. (2005) Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*, **433**, 760–764.
25. Dahl, J.-A., Duggal, S., Coulston, N., Millar, D., Melki, J., Shahdadfar, A., Brinchmann, J.E., Collas, P. (2008) Genetic and epigenetic instability of human bone marrow mesenchymal stem cells expanded in autologous serum or fetal bovine serum. *Int. J. Dev. Biol.*, **52**, 1033–1042.

26. Dean, D.B., Watson, J.T., Moed, B.R. and Zhang, Z. (2009) Role of bone morphogenetic proteins and their antagonists in healing of bone fracture. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.*, **14**, 2878–2888.
27. De Bari, C., Dell'Accio, F., Karystinou, A., Guillot, P.V., Fisk, N.M., Jones, E.A., McGonagle, D., Khan, I.M., Archer, C.W., Mitsiadis, T.A., Donaldson, A.N., Luyten, F.P., Pitzalis, C. (2008) A biomarker-based mathematical model to predict bone-forming potency of human synovial and periosteal mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum.*, **58**, 240–250.
28. Degistirici, O., Jäger, M. and Knipper, A. (2008) Applicability of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells in tissue engineering concepts. *Cell Prolif.*, **41**, 421–440.
29. Derzic, S., Slone, V. and Sender, L. (2005) IL-2-activated cord blood mononuclear cells. *Cytotherapy*, **7**, 408–416.
30. De Schauwer, C., Meyer, E., Cornillie, P., De Vliegher, S., van de Walle, G.R., Hoogewijs, M., Declercq, H., Govaere, J., Demeyere, K., Cornelissen, M., Van Soom, A. (2011) Optimization of the isolation, culture, and characterization of equine umbilical cord blood mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng. Part C Methods*, **17**, 1061–1070.
31. Devescovi, V., Leonardi, E., Ciapetti, G. and Cenni, E. (2008) Growth factors in bone repair. *Chir. Organi Mov.*, **92**, 161–168.
32. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, **8**, 315–317.
33. Dowthwaite, G.P., Bishop, J.C., Redman, S.N., Khan, I.M., Rooney, P., Evans, D.J.R., Haughton, L., Bayram, Z., Boyer, S., Thomson, B., Wolfe, M.S., Archer, C.W. (2004) The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J. Cell Sci.*, **117**, 889–897.
34. Erices, A., Conget, P. and Minguell, J.J. (2000) Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.*, **109**, 235–242.
35. Fan, X., Liu, T., Liu, Y., Ma, X. and Cui, Z. (2009a) Optimization of primary culture condition for mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood with factorial design. *Biotechnol. Prog.*, **25**, 499–507.
36. Fan, J., Varshney, R.R., Ren, L., Cai, D. and Wang, D.-A. (2009b) Synovium-derived mesenchymal stem cells: a new cell source for musculoskeletal regeneration. *Tissue Eng. Part B Rev.*, **15**, 75–86.
37. Fischer, J.C. (2008) Mesenchymal Progenitor Cells. *Cellular Diagnostics* (eds U. Sack), A. Tárnok, & G. Rothe), pp. 317–324. KARGER, Basel.
38. Fischer, E.M., Layrolle, P., Van Blitterswijk, C.A. and De Bruijn, J.D. (2003) Bone formation by mesenchymal progenitor cells cultured on dense and microporous hydroxyapatite particles. *Tissue Eng.*, **9**, 1179–1188.
39. Flynn, A., Barry, F. and O'Brien, T. (2007) UC blood-derived mesenchymal stromal cells: an overview. *Cytotherapy*, **9**, 717–726.

40. Forraz, N. and McGuckin, C.P. (2011) The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. *Cell Prolif.*, **44**, 60–69.
41. Friedenstein, A.J., Piatetzky-Shapiro, I.I. and Petrakova, K.V. (1966) Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **16**, 381–390.
42. Garrison, K.R., Shemilt, I., Donell, S., Ryder, J.J., Mugford, M., Harvey, I., Song, F., Alt, V. (2010) Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults. *Cochrane Database Syst. Rev. Online*, **6**, CD006950.
43. Gelse, K., von der Mark, K., Aigner, T., Park, J. and Schneider, H. (2003) Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells. *Arthritis Rheum.*, **48**, 430–441.
44. Germenis, A.E. and Karanikas, V. (2010) Cord blood as a source of non-senescent lymphocytes for tumor immunotherapy. *J. Reprod. Immunol.*, **85**, 47–50.
45. Gluckman, E., Devergie, A., Bourdeau-Esperou, H., Thierry, D., Traineau, R., Auerbach, A., Broxmeyer, H.E. (1990) Transplantation of umbilical cord blood in Fanconi's anemia. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, **32**, 423–425.
46. Gonzalo-Daganzo, R., Regidor, C., Martín-Donaire, T., Rico, M.A., Bautista, G., Krsnik, I., Fores, R., Ojeda, E., Sanjuan, I., Garcia-Marco, J.A., Navarro, B., Gil, S., Sanchez, R., Panadero, N., Gutierrez, Y., Garcia-Berciano, M., Perez, N., Millan, I., Cabrera, R., Fernandez, M.N. (2009) Results of a pilot study on the use of third-party donor mesenchymal stromal cells in cord blood transplantation in adults. *Cytotherapy*, **11**, 278–288.
47. Greenwald, A.S., Boden, S.D., Goldberg, V.M., Khan, Y., Laurencin, C.T. and Rosier, R.N. (2001) Bone-Graft Substitutes: Facts, Fictions, and Applications. *J Bone Jt. Surg Am*, **83**, S98–103.
48. Gronthos, S., Brahimi, J., Li, W., Fisher, L.W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P.G., Shi, S. (2002) Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.*, **81**, 531–535.
49. Guichelaar, M.M.J., Schmoll, J., Malinchoc, M. and Hay, J.E. (2007) Fractures and avascular necrosis before and after orthotopic liver transplantation: long-term follow-up and predictive factors. *Hepatol. Baltim. Md*, **46**, 1198–1207.
50. Gutowska, A., Jeong, B. and Jasionowski, M. (2001) Injectable gels for tissue engineering. *Anat. Rec.*, **263**, 342–349.
51. Hernigou, P., Poignard, A., Beaujean, F. and Rouard, H. (2005) Percutaneous Autologous Bone-Marrow Grafting for Nonunions. Influence of the Number and Concentration of Progenitor Cells. *J Bone Jt. Surg Am*, **87**, 1430–1437.
52. Hernigou, P., Poignard, A., Zilber, S. and Rouard, H. (2009) Cell therapy of hip osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Indian J. Orthop.*, **43**, 40–45.

53. Hilton, M.J., Tu, X., Wu, X., Bai, S., Zhao, H., Kobayashi, T., Kronenberg, H.M., Teitelbaum, S.L., Ross, F.P., Kopan, R., Long, F. (2008) Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation. *Nat. Med.*, **14**, 306–314.
54. Hofstetter, C.P., Schwarz, E.J., Hess, D., Widenfalk, J., El Manira, A., Prockop, D.J., Olson, L. (2002) Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 2199–2204.
55. Horner, E.A., Kirkham, J., Wood, D., Curran, S., Smith, M., Thomson, B., Yang, X.B. (2010) Long bone defect models for tissue engineering applications: criteria for choice. *Tissue Eng. Part B Rev.*, **16**, 263–271.
56. Horwitz, E.M., Gordon, P.L., Koo, W.K.K., Marx, J.C., Neel, M.D., McNall, R.Y., Muul, L., Hofmann, T. (2002) Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 8932–8937.
57. Horwitz, E., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Kraus, D.S., Keating, A. (2005) Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, **7**, 393–395.
58. Horwitz, E.M., Prockop, D.J., Fitzpatrick, L.A., Koo, W.W.K., Gordon, P.L., Neel, M., Sussman, M., Orchard, P., Marx, J.C., Pyeritz, R.E., Brenner, M.K. (1999) Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*, **5**, 309–313.
59. Huang, G.T.-J., Gronthos, S. and Shi, S. (2009) Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J. Dent. Res.*, **88**, 792–806.
60. Huang, Z., Nelson, E.R., Smith, R.L. and Goodman, S.B. (2007) The sequential expression profiles of growth factors from osteoprogenitors [correction of osteoprogenitors] to osteoblasts in vitro. *Tissue Eng.*, **13**, 2311–2320.
61. Jäger, M., Bachmann, R., Scharfstädt, A. and Krauspe, R. (2006) Ovine cord blood accommodates multipotent mesenchymal progenitor cells. *Vivo Athens Greece*, **20**, 205–214.
62. Jäger, M., Hernigou, P., Zilkens, C., Herten, M., Fischer, J. and Krauspe, R. (2010) Zelltherapie bei Knochenheilungsstörungen. *Orthop.*, **39**, 449–462; quiz 463.
63. Jäger, M., Jelinek, E.M., Wess, K.M., Scharfstädt, A., Jacobson, M., Kevy, S.V., Krauspe, R. (2009a) Bone marrow concentrate: a novel strategy for bone defect treatment. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, **4**, 34–43.
64. Jäger, M., Sager, M., Knipper, A., Degistirici, O., Fischer, J., Kögler, G., Wernet, P., Krauspe, R. (2004) In-vitro- und In-vivo-Knochenregenerierung durch mesenchymale Stammzellen aus dem Nabelschnurblut. *Orthop.*, **33**, 1361–1372.
65. Jäger, M., Westhoff, B., Wild, A. and Krauspe, R. (2005) Knochenspanentnahme am Becken. *Orthop.*, **34**, 976–994.

66. Jäger, M., Wild, A., Lensing-Höhn, S. and Krauspe, R. (2003) Einfluß verschiedener Kulturnährmedien auf das osteoblastäre Differenzierungsverhalten von Progenitorzellen aus Knochenmark und Nabelschnurblut. *Biomed. Tech. Eng.*, **48**, 241–244.
67. Jäger, M., Zilkens, C., Bittersohl, B. and Krauspe, R. (2009b) Cord blood--an alternative source for bone regeneration. *Stem Cell Rev.*, **5**, 266–277.
68. Jones, E.A., English, A., Kinsey, S.E., Straszynski, L., Emery, P., Ponchel, F., McGonagle, D. (2006) Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Cytometry B Clin. Cytom.*, **70**, 391–399.
69. Jones, E.A., Kinsey, S.E., English, A., Jones, R.A., Straszynski, L., Meredith, D.M., Markham, A.F., Jack, A., Emery, P., McGonagle, D. (2002) Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum.*, **46**, 3349–3360.
70. Jones, E. and McGonagle, D. (2008) Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatol. Oxf. Engl.*, **47**, 126–131.
71. Jones, K.B., Seshadri, T., Krantz, R., Keating, A. and Ferguson, P.C. (2008) Cell-Based Therapies for Osteonecrosis of the Femoral Head. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, **14**, 1081–1087.
72. Karystinou, A., Dell’Accio, F., Kurth, T.B.A., Wackerhage, H., Khan, I.M., Archer, C.W., Jones, E.A., Mitsiadis, T.A., DeBari, C. (2009) Distinct mesenchymal progenitor cell subsets in the adult human synovium. *Rheumatol. Oxf. Engl.*, **48**, 1057–1064.
73. Kawate, K., Yajima, H., Ohgushi, H., Kotobuki, N., Sugimoto, K., Ohmura, T., Kobata, Y., Shigematsu, K., Kawamura, K., Tamai, K., Takakura, Y. (2006) Tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with beta-tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula. *Artif. Organs*, **30**, 960–962.
74. Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H. and Bieback, K. (2006) Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *STEM CELLS*, **24**, 1294–1301.
75. Khan, Y., Yaszemski, M.J., Mikos, A.G. and Laurencin, C.T. (2008) Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *J. Bone Joint Surg. Am.*, **90 Suppl 1**, 36–42.
76. Kode, J.A., Mukherjee, S., Joglekar, M.V. and Hardikar, A.A. (2009) Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*, **11**, 377–391.
77. Kögler, G., Sensken, S. and Wernet, P. (2006) Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. *Exp. Hematol.*, **34**, 1589–1595.
78. Kostenuik, P.J. and Shalhoub, V. (2001) Osteoprotegerin: a physiological and pharmacological inhibitor of bone resorption. *Curr. Pharm. Des.*, **7**, 613–635.

79. Kuznetsov, S.A., Krebsbach, P.H., Satomura, K., Kerr, J., Riminucci, M., Benayahu, D., Robey, P.G. (1997) Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, **12**, 1335–1347.
80. Kuznetsov, S.A., Mankani, M.H., Gronthos, S., Satomura, K., Bianco, P. and Robey, P.G. (2001) Circulating Skeletal Stem Cells. *J. Cell Biol.*, **153**, 1133–1140.
81. Lane, J.M., Yasko, A.W., Tomin, E., Cole, B.J., Waller, S., Browne, M., Turek, T., Gross, J. (1999) Bone marrow and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in osseous repair. *Clin. Orthop.*, 216–227.
82. Li, J., Mareddy, S., Tan, D.M., Crawford, R., Long, X., Miao, X., Xiao, Y. (2009) A Minimal Common Osteochondrocytic Differentiation Medium for the Osteogenic and Chondrogenic Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells in the Construction of Osteochondral Graft. *Tissue Eng. Part A*, **15**, 2481–2490.
83. Liu, Z.-J., Zhuge, Y. and Velazquez, O.C. (2009) Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.*, **106**, 984–991.
84. Lu, X., Alshemali, S., de Wynter, E.A. and Dickinson, A.M. (2010) Mesenchymal stem cells from CD34(-) human umbilical cord blood. *Transfus. Med. Oxf. Engl.*, **20**, 178–184.
85. Majhail, N.S., Brunstein, C.G., Tomblyn, M., Thomas, A.J., Miller, J.S., Arora, M., Kaufman, D.S., Burns, L.J., Slungaard, A., McGlave, P.B., Wagner, J.E., Weisdorf, D.J. (2008) Reduced-intensity allogeneic transplant in patients older than 55 years: unrelated umbilical cord blood is safe and effective for patients without a matched related donor. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.*, **14**, 282–289.
86. Martiniaková, M., Grosskopf, B., Omelka, R., Vondráková, M. and Bauerová, M. (2007) Histological analysis of ovine compact bone tissue. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.*, **69**, 409–411.
87. Martini, L., Fini, M., Giavaresi, G. and Giardino, R. (2001) Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp. Med.*, **51**, 292–299.
88. Megas, P. and Panagiotis, M. (2005) Classification of non-union. *Injury*, **36 Suppl 4**, S30–37.
89. Morishita, T., Honoki, K., Ohgushi, H., Kotobuki, N., Matsushima, A. and Takakura, Y. (2006) Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three cases of cultured bone grafts derived from patients' mesenchymal stem cells. *Artif. Organs*, **30**, 115–118.
90. Muraglia, A., Cancedda, R. and Quarto, R. (2000) Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J. Cell Sci.*, **113 (Pt 7)**, 1161–1166.
91. Muschler, G.F., Nitto, H., Boehm, C.A. and Easley, K.A. (2001) Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.*, **19**, 117–125.

92. Nafei, A., Danielsen, C.C., Linde, F. and Hvid, I. (2000) Properties of growing trabecular ovine bone. Part I: mechanical and physical properties. *J. Bone Joint Surg. Br.*, **82**, 910–920.
93. Nakahara, H., Misawa, H., Hayashi, T., Kondo, E., Yuasa, T., Kubota, Y., Seita, M., Kawamoto, H., Hassan, W.A., Hassan, R.A., Javed, S.M., Tanaka, M., Endo, H., Noguchi, H., Matsumoto, S., Takata, K., Tashiro, Y., Nakaji, S., Ozaki, T., Kobayashi, N. (2009) Bone repair by transplantation of hTERT-immortalized human mesenchymal stem cells in mice. *Transplantation*, **88**, 346–353.
94. Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., Oh-hora, M., Feng, J.Q., Bonewald, L.F., Kodama, T., Wutz, A., Wagner, E.F., Penninger, J.M., Takayanagi, H. (2011) Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med*, **17**, 1231–1234.
95. Neuhuber, B., Swanger, S.A., Howard, L., Mackay, A. and Fischer, I. (2008) Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Exp. Hematol.*, **36**, 1176–1185.
96. Newcomb, J.D., Sanberg, P.R., Klasko, S.K. and Willing, A.E. (2007) Umbilical Cord Blood Research: Current and Future Perspectives. *Cell Transplant.*, **16**, 151–158.
97. Newman, E., Turner, A.S. and Wark, J.D. (1995) The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone*, **16**, 277S–284S.
98. Niedhart C, Niethard FU: Klinische Anforderungen an Knochenersatzstoffe. In: Puhl W (Hrsg): Bioceramics in Orthopaedics - New Applications, Ferdinand Enke, Stuttgart, 1998, S. 46-50.
99. Orthopedic Reviews. 2010; 2:(s1), PAGEPress, Pavia, Italy.
100. Park, J., Setter, V., Wixler, V. and Schneider, H. (2009) Umbilical cord blood stem cells: induction of differentiation into mesenchymal lineages by cell-cell contacts with various mesenchymal cells. *Tissue Eng. Part A*, **15**, 397–406.
101. Pearce, A.I., Richards, R.G., Milz, S., Schneider, E. and Pearce, S.G. (2007) Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur. Cell. Mater.*, **13**, 1–10.
102. Peister, A., Mellad, J.A., Larson, B.L., Hall, B.M., Gibson, L.F. and Prockop, D.J. (2004) Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*, **103**, 1662–1668.
103. Petite, H., Viateau, V., Bensaïd, W., Meunier, A., de Pollak, C., Bourguignon, M., Oudina, K., Sedel, L., Guillemain, G. (2000) Tissue-engineered bone regeneration. *Nat. Biotechnol.*, **18**, 959–963.
104. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshk, D.R. (1999a) Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, **284**, 143–147.

105. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshk, D.R. (1999b) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, **284**, 143–147.
106. Pollock, R., Alcelik, I., Bhatia, C., Chuter, G., Lingutla, K., Budithi, C., Krishna, M. (2008) Donor site morbidity following iliac crest bone harvesting for cervical fusion: a comparison between minimally invasive and open techniques. *Eur. Spine J. Off. Publ. Eur. Spine Soc. Eur. Spinal Deform. Soc. Eur. Sect. Cerv. Spine Res. Soc.*, **17**, 845–852.
107. Rosset, P. and Coipeau, P. (2007) [What's new in fundamental research: osteogenesis and stem cells]. *Rev. Chir. Orthopédique Réparatrice Appar. Mot.*, **93**, 2S55–58.
108. Sackstein, R., Merzaban, J.S., Cain, D.W., Dagia, N.M., Spencer, J.A., Lin, C.P., Wohlgemuth, R. (2008) Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nat. Med.*, **14**, 181–187.
109. Shetty, P., Cooper, K. and Viswanathan, C. (2010) Comparison of proliferative and multilineage differentiation potentials of cord matrix, cord blood, and bone marrow mesenchymal stem cells. *Asian J. Transfus. Sci.*, **4**, 14–24.
110. Spicer, P.P., Kretlow, J.D., Young, S., Jansen, J.A., Kasper, F.K. and Mikos, A.G. (2012) Evaluation of Bone Regeneration Using the Rat Critical Size Calvarial Defect. *Nat. Protoc.*, **7**, 1918–1929.
111. Stevens, B., Yang, Y., Mohandas, A., Stucker, B. and Nguyen, K.T. (2008) A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, **85**, 573–582.
112. Thomas, L. *Labor Und Diagnose, TH-Books, Frankfurt Am Main, 2005, ISBN 3-9805215-5-9.*
113. Tisato, V., Naresh, K., Girdlestone, J., Navarrete, C. and Dazzi, F. (2007) Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund UK*, **21**, 1992–1999.
114. Tondreau, T., Meuleman, N., Delforge, A., Dejeneffe, M., Leroy, R., Massy, M., Mortier, C., Bron, D., Lagneaux, L. (2005) Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells Dayt. Ohio*, **23**, 1105–1112.
115. Turnovcova, K., Ruzickova, K., Vanecek, V., Sykova, E. and Jendelova, P. (2009) Properties and growth of human bone marrow mesenchymal stromal cells cultivated in different media. *Cytotherapy*, **11**, 874–885.
116. Udagawa, N., Takahashi, N., Katagiri, T., Tamura, T., Wada, S., Findlay, D.M., Martin, T.J., Hirota, H., Taga, T., Kishimoto, T., Suda, T. (1995) Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *J. Exp. Med.*, **182**, 1461–1468.

117. Urashima, M., Hoshi, Y., Akiyama, M., Kamijo, M., Kato, Y., Akatsuka, J., Maekawa, K., Matsuzaki, M., Ohnishi, J., Kaihara, C. (1995) Ex vivo expansion of umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells by combinations of cytokines. *Acta Paediatr. Jpn. Overseas Ed.*, **37**, 160–165.
118. Valenti, M.T., Carbonare, L.D., Donatelli, L., Bertoldo, F., Zanatta, M. and Lo Cascio, V. (2008) Gene expression analysis in osteoblastic differentiation from peripheral blood mesenchymal stem cells. *Bone*, **43**, 1084–1092.
119. Vermes, C., Glant, T.T., Hallab, N.J., Fritz, E.A., Roebuck, K.A. and Jacobs, J.J. (2001) The potential role of the osteoblast in the development of periprosthetic osteolysis: review of in vitro osteoblast responses to wear debris, corrosion products, and cytokines and growth factors. *J. Arthroplasty*, **16**, 95–100.
120. Vladimirov, B.S. and Dimitrov, S.A. (2004) Growth factors--importance and possibilities for enhancement of the healing process in bone fractures. *Folia Med. (Plovdiv)*, **46**, 11–17.
121. Wagner, J.E., Rosenthal, J., Sweetman, R., Shu, X.O., Davies, S.M., Ramsay, N.K.C., McGlave, P.B., Sender, L., Cairo, M.S. (1996) Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: Analysis of engraftment and acute graft- versus-host disease. *Blood*, **88**, 795–802.
122. Wakitani, S., Saito, T. and Caplan, A.I. (1995) Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*, **18**, 1417–1426.
123. Walter, D.H., Haendeler, J., Reinhold, J., Rochwalsky, U., Seeger, F., Honold, J., Hoffmann, J., Urbich, C., Lehmann, R., Arenzana-Seisdesdos, F., Aicher, A., Heeschen, C. Fichtlscherer, S., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. (2005) Impaired CXCR4 signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Circ. Res.*, **97**, 1142–1151.
124. Wang, X., Cheng, Q., Li, L., Wang, J., Xia, L., Xu, X., Sun, Z. (2011) Toll-like receptors 2 and 4 mediate the capacity of mesenchymal stromal cells to support the proliferation and differentiation of CD34(+) cells. *Exp. Cell Res.*
125. Wexler, S.A., Donaldson, C., Denning-Kendall, P., Rice, C., Bradley, B. and Hows, J.M. (2003) Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal “stem” cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br. J. Haematol.*, **121**, 368–374.
126. Wheeler, D.L. and Enneking, W.F. (2005) Allograft bone decreases in strength in vivo over time. *Clin. Orthop.*, 36–42.
127. Wildemann, B., Kadow-Romacker, A., Pruss, A., Haas, N.P. and Schmidmaier, G. (2007) Quantification of growth factors in allogenic bone grafts extracted with three different methods. *Cell Tissue Bank.*, **8**, 107–114.
128. Willie, B.M., Bloebaum, R.D., Bireley, W.R., Bachus, K.N. and Hofmann, A.A. (2004) Determining relevance of a weight-bearing ovine model for bone ingrowth assessment. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **69**, 567–576.

129. Windhagen, H., Witte, F., Thorey, F., Hurschler, C. and Wirth, C.J. (2004) [Injectable carrier system for growth factor application in minimally invasive stimulation of bone healing]. *Orthop.*, **33**, 1378–1385.
130. Wozney, J.M. and Rosen, V. (1998) Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin. Orthop.*, 26–37.
131. Yang, S.-E., Ha, C.-W., Jung, M., Jin, H.-J., Lee, M., Song, H., Choi, S., Yang, Y.S. (2004) Mesenchymal stem/progenitor cells developed in cultures from UC blood. *Cytotherapy*, **6**, 476–486.
132. Yazid, M.D., Zainal Ariffin, S.H., Senafi, S., Zainal Ariffin, Z. and Megat Abdul Wahab, R. (2011) Stem Cell Heterogeneity of Mononucleated Cells from Murine Peripheral Blood: Molecular Analysis. *ScientificWorldJournal*, **11**, 2150–2159.
133. Yoshikawa, H., Tamai, N., Murase, T. and Myoui, A. (2009) Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *J. R. Soc. Interface R. Soc.*, **6 Suppl 3**, S341–348.
134. Zamzam, M.M., Abak, A.A., Bakarman, K.A., Al-Jassir, F.F., Khoshhal, K.I. and Zamzami, M.M. (2009) Efficacy of aspiration and autogenous bone marrow injection in the treatment of simple bone cysts. *Int. Orthop.*, **33**, 1353–1358.
135. Zander, Y. (2009) *Interface- Und Zementanalyse Zementierter Hüftendoprothesen Unter Dem Aspekt Der Frühzeitigen Aseptischen Prothesenlockerung Am Tiermodell Schaf*. Justus-Liebig-Universität Gießen, VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen.
136. Zannettino, A.C., Paton, S., Arthur, A., Khor, F., Itescu, S., Gimble, J.M., Gronthos, S. (2008) Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J. Cell. Physiol.*, **214**, 413–421.
137. Zhang, X., Hirai, M., Cantero, S., Ciubotariu, R., Dobrila, L., Hirsh, A., Igura, K., Satoh, H., Yokomi, I., Nishimura, T., Yamaguchi, S., Yoshimura, K., Rubinstein, P., Takahashi, T.A. (2011) Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *J. Cell. Biochem.*, **112**, 1206–1218.
138. Zhou, S., Greenberger, J.S., Epperly, M.W., Goff, J.P., Adler, C., Leboff, M.S., Glowacki J. (2008) Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell*, **7**, 335–343.
139. Zvaifler, N.J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C.J., Moss, J., Burger, J.A., Maini, R.N. (2000) Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.*, **2**, 477–488.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

µl	Mikroliter
ABC	Avidin and Biotinylated horseradish Peroxidase macromolecular Complex
Abb.	Abbildung
ad	adipogen
ALP	Alkalische Phosphatase
AML	akute myeloische Leukämie
AN	Adiponectin
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARCO	Association for Research of Circulation Osseous
Art. Nr.	Artikelnummer
BIP	Bruttoinlandsprodukt
(rh)BMP	(recombinant human) bone morphogenetic protein
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
CB	engl. Cord Blood
CFU(-F)	engl. Colony-Forming-Unit(-Fibroblasts)
CD	Cluster of differentiation
ch	chondrogen
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Col I/II	Collagen I/II
CP	Cartilage Proteoglycan
CSBD	engl. Critical sized bone defect
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAG	Dexamethason-Ascorbinsäurephosphat-Glycerophosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS	fetal bovine serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluorescein isothiocyanat
FOR	Fat Oil Red = Ölröt O
g	Erdschwerebeschleunigung, Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	engl. Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF	engl. Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
I.E.	internationale Einheit
IFN γ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IGF	Insulin-like Growth Factors
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium Supplement
Kap.	Kapitel
KM	Knochenmark
Konz.	Konzentration
LNGFR	engl. Low-affinity nerve growth factor receptor
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MHC I/II	engl. Major Histocompatibility Complex I/II
Mg	Magnesium
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP-1 β	Macrophage Inflammatory Protein 1 β
ml	Milliliter
mod.	modifiziert
monokl.	monoklonal

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MNC	mononukleäre Zellen
MSC	engl. multipotent mesenchymal stromal/stem cells
MPC	multipotente mesenchymale Progenitorzellen
n	Anzahl
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NSAID	engl. nonsteroidal antiinflammatory drugs
o	ovin
OI	Osteogenesis imperfecta
OC	Osteocalcin
os	osteogen
PB	peripheres Blut
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
polykl.	polyklonal
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
P/S/G	Penicillin/Streptomycin/Glutamin
Rank	engl. Receptor Activator of NF-κB
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SC	engl. stem cell, Stammzelle
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
USSC	engl. Unrestricted Somatic Stem Cells
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb.1 Relative Komplikationshäufigkeit nach Knochenspanentnahme aus dem Beckenkamm unter Berücksichtigung der aktuellen wissenschaftlichen Literatur (mod. n. Jäger et al., 2005).....	8
Abb.2 Belastungsstabilität und Osteoinduktion verschiedener Knochenersatzstoffe (PLA:Poly-L-Lactid; TCP:Tricalciumphosphat; PDGF:Platelet-derived Growth Factor; BMP:Bone Monphogenetic Protein); mod. nach C.Niedhart ("Niedhart C, Niethard FU: Klinische Anforderungen an Knochenersatzstoffe. In: Puhl W (Hrsg): Bioceramics in Orthopaedics - New Applications, Ferdinand Enke, Stuttgart, 1998, S. 46-50.") ..	10
Abb.3 Schema zur Stammzellentwicklung prä- und postnatal (Mod. n. Jäger et al., 2009b).....	12
Abb.4 Molekulare Mechanismen der Induktion osteogener Differenzierung von humanen MSC nach Inflammation/Verletzung/Trauma (Jäger et al., 2009b).....	15
Abb.5 Gradient aus peripherem ovinen Blut (die Schicht mit den Monozyten wurde bis zur Erythrozytengrenze vollständig abpipettiert)	25
Abb.6 Gradient aus peripherem humanen Blut (mod. n. http://www.chemagen.com/buffy-coat.html).....	25
Abb.7 Wellplatte für einen Kinetikpunkt (O:osteogen stimuliert; A:adipogen stimuliert; C:chondrogen stimuliert; K:unstimulierte Kontrolle).....	26
Abb.8 Dot-Plot-Darstellung der auf Vollblutzellen (Schaf 4) gemessenen CD-Marker. Analysefenster: vitale Zellen; x-Achse: antikörpermarkierte Zellen; y-Achse: DRAQ5-markierte Zellen; die Achsenausrichtung zur Bestimmung des Anteils an spezifisch markierten Zellen erfolgt anhand der Negativkontrollen IgG1 FITC/PE (s. erste Reihe). Zu dem Testzeitpunkt noch kein CD90-Antikörper verfügbar.....	43
Abb.9 Dot-Plot-Darstellung der auf den P0-Zellen (Schaf 8) gemessenen CD-Marker; Analysefenster: vitale Zellen; x-Achse: antikörpermarkierte Zellen; y-Achse: DRAQ5-markierte Zellen; Koordinatenkreuzausrichtung nach Negativkontrolle IgG1 FITC/PE.....	45
Abb.10 Dot-Plot-Darstellung der auf den P1-Zellen (Schaf 8) gemessenen CD-Marker; Analysefenster: vitale Zellen; x-Achse: antikörpermarkierte Zellen; y-Achse: DRAQ5-markierte Zellen; die Achsenausrichtung zur Bestimmung des Anteils an spezifisch markierten Zellen erfolgt anhand der Negativkontrollen IgG1 FITC/PE (s. erste Reihe).....	47

Abb.11	Dot-Plot-Darstellung der auf den P3-Zellen (Schaf 3) gemessenen CD-Marker. Die Messung des CD90-Markers erfolgte auf den P3-Zellen des Schaf 7; Analysefenster: vitale Zellen; x-Achse: antikörpermarkierte Zellen; y-Achse: DRAQ5-markierte Zellen; die Achsenausrichtung zur Bestimmung des Anteils an spezifisch markierten Zellen erfolgt anhand der Negativkontrollen IgG1 FITC/PE (s. erste Reihe).....	49
Abb.12	Dot-Plot-Darstellung der auf den P3-Zellen der Nabelschnurblutreihe (Schaf 11) gemessenen CD-Marker; Analysefenster: vitale Zellen; x-Achse: antikörpermarkierte Zellen; y-Achse: DRAQ5-markierte Zellen; die Achsenausrichtung zur Bestimmung des Anteils an spezifisch markierten Zellen erfolgt anhand der Negativkontrollen IgG1 FITC/PE (s. erste Reihe).....	51
Abb.13	Tag 7 der Zellkultur. Zwei morphologisch unterschiedliche Zelltypen erkennbar: 1. spindelförmige Zellen (←) 2. abgeplattete Zellen mit Ausläufern (Δ). Zellreihe Schaf 1 P1, 200-fache Vergrößerung.	52
Abb.14	Zelluläre 3D-Konstrukte, Tag 7 der chondrogenen Stimulation.....	53
Abb.15	Knochenknötchen (sog. bone nodules), Tag 9 der osteogenen Stimulation.....	53
Abb.16	Lokale Anhäufung von Fettvakuolen, Tag 15 der adipogenen Stimulation.....	53
Abb.17	Unstimulierte Kontrollgruppe, Tag 14 der Kultivierung.	53
Abb.18	Exemplarische Einstufung der Anfärbbarkeit von links nach rechts: geringe Intensität (1 Punkt), mittlere Intensität (2 Punkte), hohe Intensität (3 Punkte).....	54
Abb.19	Arithmetisches Mittel inkl. Standardabweichung der Farbintensität für die jeweiligen Marker am Versuchstag 10 und 21, n:2-4; AN:Adiponectin, FOR:Ölrot O, CP:Cartilage Proteoglycan, Col II:Collagen II, Safr.O:Safranin O, OC:Osteocalcin, ALP:alkalische Phosphatase; Fehlende Balken entsprechen Wert 0	55
Abb.20	Repräsentative Fotos der Anfärbbarkeit mit den oben genannten Antikörpern am Inkubationstag 10. Erste und dritte Reihe (S): Chondrogen, osteogen und adipogen stimulierte Zellen; Zweite und vierte Reihe (K): unstimulierten Kontrollen unter den gleichen Färbebedingungen. Fünfte Reihe: Negativkontrollen (ms:Maus; gt:Ziege; rb:Kaninchen); Zellreihen: Schaf 1, Schaf 7, Schaf 8 und Schaf 14; 200-fache bzw. 400-fache Vergrößerung.	57

Abb.21	Repräsentative Fotos der Anfärbbarkeit mit den oben genannten Antikörpern am Inkubationstag 21. Erste und dritte Reihe (S): Chondrogen, osteogen und adipogen stimulierte Zellen; zweite und vierte Reihe (K): Unstimulierte Kontrollen unter den gleichen Färbebedingungen. Fünfte Reihe: Negativkontrollen (ms:Maus; gt:Ziege; rb:Kaninchen); Zellreihen Schaf 1, Schaf 7, Schaf 8 und Schaf 14; 400-fache Vergrößerung.....	59
Abb.22	Safranin O-positiver 3D-Zellkonstrukt in der chondrogen stimulierten Zelllinie (links), unstimulierte Kontrolle (rechts); Schaf 8, Tag 21 der Stimulation; 200-fache Vergrößerung.	60
Abb.23	Alcianblau-PAS gefärbte chondrogen stimulierte Zelllinie (links), unstimulierte Kontrolle (rechts); Schaf 14, Tag 21 der Stimulation; 400-fache Vergrößerung.	60
Abb.24	Ölrot O-positive intrazelluläre Vakuolen in der adipogen stimulierten Kultur (links), unstim. Kontrolle (rechts); Schaf 8, Tag 21 der Stimulation; Kernfärbung mit Mayers Hämalaun (blau), 400-fache Vergrößerung.	60
Abb.25	Teils gruppierte Expression von ALP (türkisblau) in der osteogen stimulierten Zellkultur; Schaf 1, Tag 10 der Inkubation.....	61
Abb.26	Diffuse Verteilung der ALP in der unstimulierten Kontrolle. Schaf 1, Tag 10 der Inkubation.....	61
Abb.27	Starke, gruppierte Expression von ALP am Tag 21 der osteogenen Inkubation, Kernfärbung mit Mayers Hämalaun (blau-violette).....	61
Abb.28	Weiterhin ungerichtete Verteilung der ALP-Expression in der unstimulierten Zellkultur. Tag 21 der Inkubation.....	61
Abb.29	Darstellung von Osteocalcin am Tag 10 der Stimulation.....	63
Abb.30	Darstellung vom ALP blau (Kernfärbung mit Kernechtrot) am Tag 10 der Stimulation.....	63
Abb.31	Am Tag 21 der Stimulation ist die Mineralisierung mithilfe von Alizarin rot nachweisbar	63
Abb.32	Stärkere Ausprägung der ALP am Tag 21 (ohne Kernfärbung); Osteogen stimulierte CB-Zellkultur (Schaf 10 und 11); 400-fache Vergrößerung.	63
Abb.33	Bereits am Tag 10 der Stimulation deutliche Anfärbbarkeit von Collagen II.....	63
Abb.34	Anfärbbarkeit von CP am Tag 10 der Stimulation.	63

Abb.35	Am Tag 10 weisen nur einzelne Bereiche saure Mucopolysaccharide auf.....	63
Abb.36	Am Tag 21 deutliche Zunahmen der Mucopolysaccharide erkennbar; Chondrogen stimulierte CB-Zellkultur (Schaf 10 und 11); 400-fache Vergrößerung.	63
Abb.37	Deutliche Anfärbbarkeit von PPAR γ am Tag 21 der Stimulation;	64
Abb.38	Deutliche Anfärbbarkeit von Adiponectin am Tag 21 der Stimulation;	64
Abb.39	Am Tag 10 nur einzelne Zellen mit Ölrot O-positiven Fettvakuolen;	64
Abb.40	Am Tag 21 beinhaltet bereits ein Großteil der Zellen konfluierende Fettvakuolen; 400-fache Vergrößerung. Adipogen stimulierte CB-Zellreihen: Schaf 10 und Schaf 11.	64
Abb.41	Fotoausschnitte von Agarosegelplatten nach erfolgter RT-PCR und Elektrophorese. L:DNA-Leiter in Basenpaaren (quantitativer Standard), K:Kontrolle aus aqua bidestillata; PPAR:Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor, AGGR:Aggrecan; K10/21:unstimulierte Zellen am Inkubationstag 10/21, C10/21:chondrogen stimulierte Zellen, A10/21:adipogen stimulierte Zellen, O10/21:osteogen stimulierte Zellen.	65
Abb.42	Agaroseplatte nach erfolgter PCR und Elektrophorese; Tag 21 der Stimulation (Probe 582 osteogen stim.; Probe 581 chondrogen stim.; Probe 580 adipogen stim.); Cord blood-Zellreihe (Schaf 11); L:DNA-Leiter in Basenpaaren (quantitativer Standard), K:Kontrolle aus aqua bidestillata; Col I:Collagen I, BGLAP:bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein: Osteocalcin.	65
Abb.43	Prozentuale Nutzung einiger wichtiger Spezies in der orthopädischen Forschung in den Jahren 1990 bis 2001 (Mod. n. L.Martini et al. 2001)	69

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab.1	Zusammensetzung des Nährmediums	25
Tab.2	Zusammensetzung der Inkubationsmedien	27
Tab.3	FACS-Protokoll (Abk.: o:anti-ovin; h:anti-human)	28
Tab.4	Lösungen für die FACS-Färbung.....	29
Tab.5	Bei der Immunzytochemie verwendete Substanzen.....	30
Tab.6	Verwendete Antikörper	31
Tab.7	PCR-Mastermix	35
Tab.8	Zusammensetzung des Ladepuffers für die Gelelektrophorese	37
Tab.9	Arithmetisches Mittel der für den jeweiligen CD-Marker positiven Zellen in den einzelnen Passage (P); Angaben in Prozent der detektierten Gesamtzellzahl. CB=cord blood; n=1-3*; Messungen zur Passage 2 wurden nicht durchgeführt. *Fehlende CD90-Messung in der Vollblut-Reihe wegen fehlender Verfügbarkeit des entsprechenden Antikörpers zum Testzeitpunkt. In der P0-Reihe konnte die CD90-Messung aus o.g. Grund nur an Schaf 8, in der P1-Reihe an Schaf 8 und Schaf 14, in der P3-Reihe an Schaf 7 erfolgen. Alle anderen Marker wurden an mindestens zwei und max. vier Zellreihen jeweils einer Passage gemessen.	51
Tab.10	Anfärbbarkeit der jeweiligen Marker am Tag 10 (Kinetikpunkt 2) und Tag 21 (Kinetikpunkt 3) der Stimulation in der CB-Zellpopulation (adipogene Stim.: Adiponectin, PPAR, Ölrot O; osteogenen Stim.: Osteocalcin, Rank, Alkalische Phosphatase; chondrogene Stim.: Cartilage Proteoglycan, Collagen II, Alcianblau-PAS); n:1-2; + : schwach, ++ : mäßig, +++ : stark, - : fehlende Anfärbbarkeit.	62
Tab.11	Expressionsintensität von AggreCAN, PPAR γ und Collagen 1 in der jeweiligen Stimulationsgruppe am Inkubationstag 10 und Tag 21 in der RT-PCR; die hellblauen Spalten beziehen sich auf das periphere Blut (PB, n=4), die dunkelblaue Spalte zeigt die Ergebnisse der Nabelschnurblutzellen am Inkubationstag 21 (n=1).....	66
Tab.12	Übereinstimmung zwischen ovinem und humanen Skelett; + wenig Übereinstimmung, ++ mäßige Übereinstimmung, +++ gute Übereinstimmung; KS : Knochenstruktur; mod. n. Al Pearce 2007 (Pearce et al., 2007).....	70

9 Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. med. Marcus Jäger, Direktor der Orthopädischen Universitätsklinik Essen, für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die kritische Beurteilung meiner Arbeit sowie für die stets raschen Rückmeldungen bei den vielen Anfragen während der mehrjährigen Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Monika Herten, Leiterin des Orthopädischen Forschungslabors des Universitätsklinikums Düsseldorf*, für ihre unermüdliche Motivation, ihre frischen Ideen und die zu allen Zeiten offene Tür und Ohr. Danke für die intensive Unterstützung!

Außerdem möchte ich mich bei Frau Sabine Lensing-Höhn, Leitende Medizinisch-Technische Assistentin am Orthopädischen Forschungslabor des Universitätsklinikums Düsseldorf*, für die Einführung in die Komplexität der Zellkultur und Immunzytochemie sowie die Unterstützung bei der RT-PCR bedanken.

Des Weiteren will ich mich bei Herrn Dr. med. Johannes Fischer, Leiter des Instituts für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des Universitätsklinikums Düsseldorf*, bedanken, der durch eine enge Zusammenarbeit mit dem Orthopädischen Forschungslabor die durchflusszytometrische Analyse der Zellen möglich gemacht hat.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie sowie meinen engen Freunden, die mich stets in den schwierigen Phasen des wissenschaftlichen Arbeitens unterstützt haben. Danke!

*Anmerkung:

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind am Universitätsklinikum Düsseldorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Marcus Jäger angefertigt worden, der im Jahr 2011 den Lehrstuhl für das Fach Orthopädie an der Universität Duisburg-Essen übernommen hat und seit 2014 Lehrstuhlinhaber für Orthopädie und Unfallchirurgie an der Universität Duisburg-Essen ist.

10 Curriculum Vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.